

ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2018/19

DOCTORANDO: **ALBARRAN SANTIÑO, M^a. ISABEL**
D.N.I./PASAPORTE: ****8844A

PROGRAMA DE DOCTORADO: **D425 SEÑALIZACIÓN CELULAR**
DPTO. COORDINADOR DEL PROGRAMA: **BIOLOGÍA DE SISTEMAS**
TITULACIÓN DE DOCTOR EN: **DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

En el día de hoy 24/01/19, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de **CARMEN BLANCO APARICIO //**.

Sobre el siguiente tema: *IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE INHIBIDORES DE CDK8/CYCLINA C SELECTIVOS*

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL¹ de (no apto, aprobado, notable y sobresaliente): Sobresaliente

Alcalá de Henares, 24 de Enero de 2019

EL PRESIDENTE

EL SECRETARIO

EL VOCAL

Fdo.: M^a. TERESA DE LOS FRAILES ALVARO

Fdo.: SONIA MARTÍNEZ GONZÁLEZ

Fdo.: FERNANDO A. RAMÓN OLAYO

Con fecha 25 de febrero de 2019 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- ☒ Conceder la Mención de "Cum Laude"
☐ No conceder la Mención de "Cum Laude"

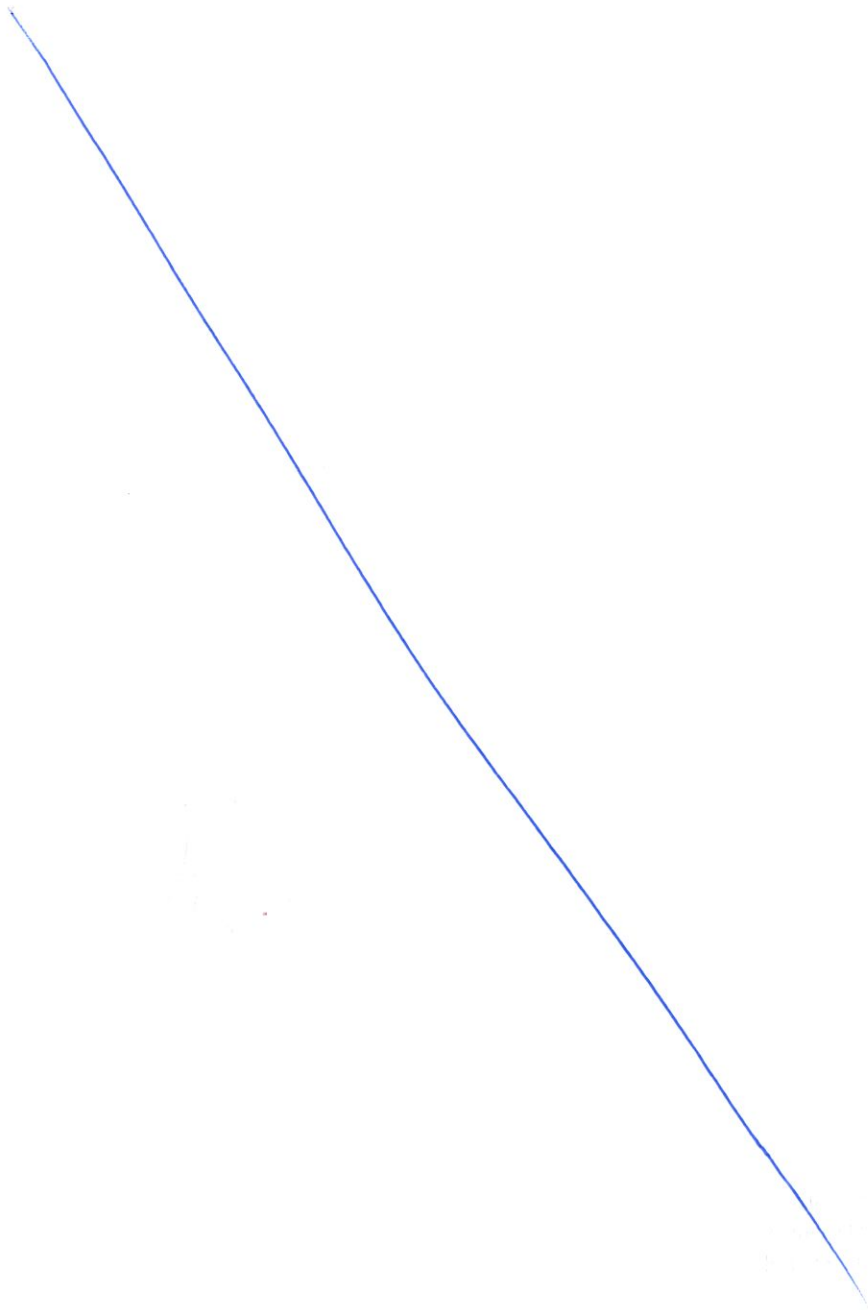
FIRMA DEL ALUMNO,

Fdo.: ALBARRAN SANTIÑO, M^a. ISABEL

La Secretaria de la Comisión Delegada

¹ La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.

INCIDENCIAS / OBSERVACIONES:





Universidad
de Alcalá

COMISIÓN DE ESTUDIOS OFICIALES
DE POSGRADO Y DOCTORADO

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 25 de febrero, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por *ALBARRAN SANTIÑO, M^a. ISABEL*, el día 24 de enero de 2019, titulada *IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE INHIBIDORES DE CDK8/CYCLINA C SELECTIVOS*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado **resuelve otorgar** a dicha tesis la

MENCIÓN "CUM LAUDE"

Alcalá de Henares, 25 de febrero de 2019
EL VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y TRANSFERENCIA



F. Javier de la Mata de la Mata

Copia por e-mail a:

Doctorando: ALBARRAN SANTIÑO, M^a. ISABEL

Secretario del Tribunal: SONIA MARTÍNEZ GONZÁLEZ

Directora de Tesis: CARMEN BLANCO APARICIO



Universidad
de Alcalá

ESCUELA DE DOCTORADO.

Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado

DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./D^a M^a. ISABEL ALBARRÁN SANTIÑO
reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, y habiendo
presentado la misma en formato: ☒ soporte electrónico ☐ impreso en papel, para el depósito de la
misma, en el Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado, con el n^o de páginas: 230 se procede, con
fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis.

Alcalá de Henares a 31 de OCTUBRE de 2018



Aurora Juárez Abril

Fdo. El Funcionario

RESTAURAR

IMPRIMIR



Programa de Doctorado: SEÑALIZACIÓN CELULAR

***Identificación y caracterización de
inhibidores de CDK8/CICLINA C selectivos***

Tesis doctoral presentada por:

M^a Isabel Albarran Santiño

Directora: Dra. Carmen Blanco Aparicio

Programa de Terapias Experimentales

Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (F.S.P. CNIO)

Alcalá de Henares, 31 de octubre de 2018



Universidad
de Alcalá

PROGRAMA DE DOCTORADO EN SEÑALIZACIÓN CELULAR

UNIDAD DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE SISTEMAS

Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud Campus universitario 28871 Alcalá de Henares (Madrid)

Teléfono 91 885 4513 / 4886 - dpto.biosistemas@uah.es - pdsc@uah.es

ALBERTO DOMINGO GALÁN,

COORDINADOR DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN SEÑALIZACIÓN CELULAR

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada “**Identificación y caracterización de inhibidores de CDK8/CICLINA C selectivos**”, presentada por D^a. María Isabel Albarrán Santiago bajo la dirección de la Dra. Carmen Blanco Aparicio, reúne los requisitos científicos de originalidad y rigor metodológicos para ser defendida ante un tribunal. La Comisión Académica ha tenido también en cuenta la evaluación positiva anual del doctorando, habiendo obtenido las correspondientes competencias establecidas en el Programa.

Y para que así conste surta los efectos oportunos, se firma el presente informe en Alcalá de Henares a 30 de octubre de 2018.

Fdo. Alberto Domingo Galán

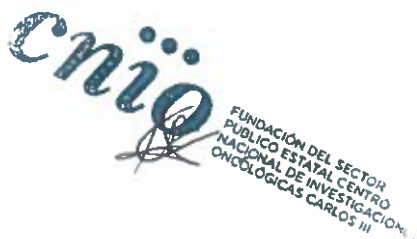
INFORMA:

Que Dña. *M^o Isabel Albarran Santiño* ha realizado la Tesis Doctoral titulada

Identificación y caracterización de inhibidores de CDK8/CICLINA C selectivos

bajo la dirección de la Dra. Carmen Blanco Aparicio en la Fundación del sector público estatal Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (F.S.P. CNIO) y bajo la tutela de la Dra. M^a José Carmena Sierra dentro del programa de Doctorado “Señalización Celular” del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá y, a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para proceder a su defensa pública.

Alcalá de Henares, a 23 de Octubre de 2018



cnio
FUNDACIÓN DEL SECTOR
PÚBLICO ESTATAL CENTRO
NACIONAL DE INVESTIGACIONES
ONCOLÓGICAS CARLOS III

Directora

Dra Carmen Blanco Aparicio
Jefa de la Sección de Biología
Programa de Terapias Experimentales
F.S.P. CNIO



Tutora

Dra. M^a José Carmena Sierra
Catedrática del Dpto. Biología de Sistemas
Universidad Alcalá

A Carmen Rodrigo Martín, por tu apoyo sin límite.

In memóriam, a mi madre y mi hermana Claudia.

A mis hijos y mi hermana Isi.

“Nuestra sociedad, en la que reina un urgente deseo de riqueza y lujos, no entiende el valor de la Ciencia. No se da cuenta de que la Ciencia es una de las partes más preciosas de su patrimonio moral. Ni ha asumido, de modo suficiente, el hecho de que la Ciencia está en la base de todo el progreso que aligera la carga de la vida y disminuye su sufrimiento”.

Marie Curie.

Primera mujer en ganar el premio Nobel en 1903.

Agradecimientos

Me gustaría mostrar mi agradecimiento a todas las personas que de una forma u otra han contribuido a que esta tesis se haya podido realizar.

Si bien este trabajo ha requerido un gran esfuerzo y mucha dedicación, sin duda no hubiera sido posible su finalización sin la ayuda de mi Directora Carmen Blanco Aparicio. (Carmen, gracias, por aceptar dirigir este trabajo y por tu gran ayuda y dedicación a lo largo de todo el proceso de elaboración de esta Tesis)

Agradecer también al Director del Programa de Terapias Experimentales del CNIO, Joaquín Pastor, por la oportunidad que me brindó de iniciar esta Tesis en el seno del Proyecto de Descubrimiento de Fármacos.

A Sonia Martínez e Inés Muñoz por su buena disposición para tenderme una mano, siempre.

A mis compañeras y compañeros del grupo de Química Médica y Biología por las aportaciones a este trabajo con los que deseo especialmente compartirlo.

Agradecer a la Universidad de Alcalá de Henares, en particular a M^a José Carmena Sierra mi tutora, por abrirme las puertas y acogerme en esta universidad y por brindarme su ayuda, tanto para darme ánimos como para indicarme cómo mejorar la calidad de este trabajo.

A Alberto Domingo Galán, Coordinador del Programa de Doctorado, por facilitarnos la vida a las/los estudiantes de Doctorado. En particular, por su eficacia en la gestión de los necesarios procedimientos burocráticos. De igual modo, agradezco la ayuda prestada por Angélica Bermúdez, Secretaria del Departamento Biología de Sistemas.

Y, por último, no quiero olvidar dar las gracias por la ayuda y el compañerismo que me brindaron Javi Klett, Javi García-Campos, Elena Gómez y Tirso Pons, Lorena Magianer, Alicia, así como a mis amigas y amigos Paloma, Juan, Nata, Pilar.

Índice

Índice	1
Índice de Abreviaturas:	4
Resumen	6
Summary.....	7
1. Introducción.	8
1.1. El cáncer y su tratamiento.....	8
1.1.1. El Cáncer.....	8
1.1.2. Estrategias farmacológicas.....	9
1.1.2.1. Proteínas quinasa como dianas terapéuticas en cáncer.....	14
1.2. CDK8 como diana terapéutica en oncología.....	18
1.2.1. Funciones biológicas de CDK8.....	18
1.2.1.1 CDK8 como regulador de la transcripción.....	19
1.2.1.2. CDK8 como regulador del ciclo celular.....	22
1.2.1.3. CDK8 como regulador de la inmunidad innata.....	23
1.2.2. CDK19 el parólogo de CDK8.....	24
1.2.3. Implicaciones de CDK8 en cáncer.....	26
1.2.3.1. CDK8 en cáncer colorectal.....	28
1.2.3.2. CDK8 en cáncer de mama.....	29
1.2.3.3. CDK8 en leucemia mieloide aguda (LMA).....	30
1.2.3.4. CDK8 en melanoma.....	31
1.2.4. Inhibición farmacológica de CDK8.....	32
1.2.4.1 Aspectos generales de las estructuras de las proteínas quinasas eucariotas (ePK).....	32
1.2.4.2. Estructura de las CDKs.....	33
1.2.4.3. Clasificación de los inhibidores de quinasas según su modo de unión.....	36
1.2.4.4. Inhibidores de CDK8 / CDK19.....	38
1.3. HASPIN como diana terapéutica en oncología.....	46
1.3.1. Funciones biológicas de HASPIN.....	46
1.3.1.1. HASPIN como quinasa mitótica.....	48
1.3.1.3. HASPIN como quinasa epigenética.....	50
1.3.2. Implicaciones de HASPIN en cáncer.....	50
1.3.3. Inhibición farmacológica de HASPIN.....	52
1.3.3.1. Estructura de HASPIN.....	53
1.3.3.2. Inhibidores de HASPIN.....	55
1.4. Aproximación al descubrimiento temprano de fármacos.....	59
1.4.1 Fases del proceso de descubrimiento de fármacos.....	60
1.4.2. Identificación y validación de la diana.....	61
1.4.3. Identificación de las moléculas de partida o “hits”.....	62
1.4.3.1. Selección de la metodología de búsqueda.....	62
1.4.3.2. Identificación de moléculas activas mediante cribado experimental.....	64
1.4.4. Validación y generación de moléculas activas o “hit generation”.....	65
1.4.5. Fase de molécula activa a cabeza de serie o “Hit to lead” (HtL).....	66
1.4.5.1 Propiedades ADME-T.....	66
1.4.5.1.1. Solubilidad, absorción y permeabilidad.....	69

1.4.5.1.2. Metabolismo de los fármacos.....	70
1.4.5.1.3. Cardiocitotoxicidad: hERG como biomarcador.....	73
1.4.6. Fase optimización del cabeza de serie o “lead optimization” (LO)	74
1.4.6.1. Estimación del tiempo de residencia para la priorización de moléculas candidatas.....	75
1.4.7. Fase de estudios preclínicos en modelos de animales.....	81
2. Objetivos	82
2.1. Objetivos globales	82
2.2. Objetivos específicos	82
3. Materiales y métodos	84
3.1. Ensayos bioquímicos para la detección de la actividad de proteínas quinasas.....	84
3.1.1. Ensayo quinasa de unión basado en la tecnología TR-FRET	84
3.1.2 Ensayo de actividad quinasa basado en la tecnología FRET	89
3.1.3. Ensayo de actividad basado en la tecnología ADP-Glo™	91
3.1.4. Diseño de placas de ensayo y criterios de calidad del ensayo.	93
3.1.5. Análisis de los datos	97
3.1.5.1. Análisis de los datos en crudo obtenidos con las diferentes tecnologías.....	97
3.1.5.2. Determinación de parámetros cinéticos.....	98
3.2. Selectividad en un amplio panel de quinasas, KINOMEscan™	101
3.3. Ensayos celulares.....	103
3.3.1. Mantenimiento y conservación de líneas celulares tumorales.....	103
3.3.2. Ensayo reportero de actividad β -CATENINA.....	103
3.3.3. Ensayo de modulación de los biomarcadores de CDK8 y de HASPIN por immuno blot.....	105
3.3.4. Ensayo de viabilidad celular.	107
3.3.5 .Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.	108
3.4. Ensayos ADME-T.....	110
3.4.1 Ensayo de solubilidad cinética.....	110
3.4.2. Ensayo de difusión pasiva (PAMPA).	112
3.4.3. Ensayo de estabilidad microsomal.	114
3.4.4 Ensayo de citocromos P450.....	116
3.4.5. Ensayo de canales de K ⁺ : hERG.	119
3.5. Estudios de farmacocinética.....	122
4. Resultados.....	126
4.1. Desarrollo y validación del ensayo de unión para la identificación de inhibidores de CDK8/CycC.....	126
4.1.1. Determinación de la concentración de enzima.....	126
4.1.2. Estimación de la constante de disociación del trazador (K _d).....	128
4.1.3. Determinación de la concentración óptima de Eu-anti-His-Tag.	129
4.1.4. Estudio de los parámetros estadísticos que establecen la calidad de un ensayo de HTS.	132
4.1.5. Estudio de la estabilidad de CDK8 / CycC, tolerancia al DMSO y miniaturización del ensayo.	134
4.1.6. Validación del ensayo con inhibidores de referencia de CDK8.	137
4.2. Identificación y generación de compuestos activos.....	138
4.2.1. Cribado de librerías para la identificación y validación de compuestos activos.....	138
4.2.2. Generación de nuevas series químicas para ampliar el espacio químico y la selección del compuesto cabeza de serie.	142
4.3. Caracterización de las moléculas de partida de la serie 5 selecciona para la fase de HtL.....	145

4.4. Fase de Optimización de propiedades del cabeza de serie “Hit to Lead” (HtL).....	150
4.5. Optimización de los compuestos líderes o “Lead optimization” (LO).....	160
4.6. Caracterización de la cinética de unión de los inhibidores pre-seleccionados con propiedades pre-fármacos.	165
4.6.1. Identificación de inhibidores según su cinetica de asociación “rápida o lenta”.	167
4.6.2. Determinación de las constantes K_i y K_d de los inhibidores con perfil farmacológico avanzado.	169
4.6.3. Determinación de las constantes de velocidad de asociación k_{on} , velocidad de disociación k_{off} y tiempo de residencia ($t_{1/2}$).	170
4.7. Estudio de la estabilidad de los inhibidores en las condiciones experimentales empleadas.	175
4.8. Estudio comparativo de los 3 compuestos líder respecto a los inhibidores de referencia Senexina B y CCT251545.....	178
5. Discusión.	182
6. Conclusiones	203
Bibliografía	205
Anexos	216
Índice de Tablas	216
Índice de Figuras	217
Tablas suplementarias:.....	220

Índice de Abreviaturas:

ACN: Acetonitrilo
 ADN: ácido dextrorribonucleico
 ADME-T: Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad
 ADP: Adenosín Difosfato.
 ARN: ácido ribonucleico
 ARNm: ácido ribonucleico mensajero
 Asp: ácido aspártico
 ATCC: Colección americana de cultivos (*American Type Culture Collection*)
 ATP: Adenosín Trifosfato
 AUC: Área bajo la curva (*Area Under the Curve*)
 BGG: Gamma-globulina bovina (*Bovine Gamma Globulin*)
 BSA: albúmina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*)
 C+: Control positivo
 C-: Control negativo
 CDK: Quinasa dependiente de ciclina (*Cyclin Dependent Kinase*)
 C_{max}: Concentración máxima
 CCR: cáncer colorectal
 CYP: citocromo P450
 CV: Coeficiente de variabilidad
 Cyc: ciclina
 DMSO: Dimetil Sulfóxido
 DTT: Ditiotreitól
 DR: Dosis respuesta
 E: Enzima
 EC₅₀: concentración efectiva que produce el 50% del efecto
 EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
 EGTA: Ácido etilenglicoltetraacético
 EI: Complejo enzima-inhibidor
 ES: Complejo enzima-sustrato
 ETP: programa de terapias experimentales (*Experimental Therapeutics Programme*)
 Eu: Europeo
 F&Q: fisicoquímico
 FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos (*Food and Drug Administration*)
 FP: Fluorescencia polarizada
 FRET: Transferencia de energía por resonancia de Förster (*Förster Resonance Energy Transfer*)
 G6PDH: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
 GFP: *Green fluorescent protein*
 GI₅₀: Concentración que inhibe el crecimiento de las células a la mitad
 GST: Glutación S-transferasa
 H3-Thr3: histona 3 fosforilada en la treonina 3
 HCC: Carcinoma hepatocelular
 HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
 hERG :human Ether-a-go-go-related Gene

HtL: Optimización del cabeza de serie (*Hit to Lead*)
 His: Histidina
 HPLC-MS: Cromatografía líquida de alta eficacia y espectrometría de masas
 HTS: Cribado de alto rendimiento (*High Throughput Screening*)
 I: Inhibidor
 IC₅₀: Concentración de inhibidor que reduce a la mitad la actividad máxima
 IP: Ioduro de propidio
 IR: Infrarrojo
 JHU: *Universidad de John Hopkins (John Hopkins University)*
 LC-MS: cromatografía líquida-espectrometría de masas (*liquid chromatography-mass spectroscopy*)
 LC-MS/MS: cromatografía líquida-espectrometría de masas en tandem
 LO: optimización del líder (*Lead Optimization*)
 M: Molar
 M&M: materiales y métodos
 mg: miligramo
 mM: minimolar
 mmHg: milímetro de mercurio
 mP: milipolarización
 MS: Microsomas
 mV: milivoltios
 N/A: no adquirido
 NADP⁺: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
 NADPH: NADP reducido
 NK: célula del sistema inmune *Nature Killer*
 nM: nanomolar
 OD: Densidad óptica
 P: grupo fosfato
 p-4EBP1: *phospho 4-E binding protein 1*
 PAMPA: Permeabilidad de Membranas Artificiales Paralelas
 PBS: Tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*)
 PdO: Prueba de concepto
 PD: farmacodinámica (*pharmacodynamics*)
 Pe: permeabilidad
 pIC₅₀: -log de la IC₅₀
 PK: Farmacocinética (*pharmacokinetics*)
 PM: peso molecular ; pM: picomolar
 pThr46: Fosfo treonina 46
 RL: Complejo receptor-ligando
 RE: Retículo Endoplasmático
 REG: Sistema de regeneración de NADPH
 RLU: Unidades relativas de luminiscencia
 rpm: revoluciones por minuto
 RPMI: medio Roswell Park Memorial Institute
 S/B: ventana de ensayo relación señal/fondo
 SAR: relación estructura-actividad cualitativa (*Structure-Activity Relationship*)
 SKR: Relación estructura-cinética (*Structure Kinetic Relationship*)

Resumen

Las quinasas del complejo mediador CDK8 y CDK19 son quinasas dependientes de ciclina C que junto con CDK7 y CDK9 forman parte del grupo de las denominadas CDKs transcripcionales. Tienen en común que fosforilan el dominio CTD terminal de la ARN polimerasa II, participando de este modo en la regulación de la transcripción. Además CDK8 independientemente del complejo mediador es una quinasa de histonas y la quinasa principal implicada en la fosforilación de STAT1-Ser727 en respuesta a interferon gamma.

CDK8 ha sido descrita como un oncogen en cáncer colorrectal y cáncer gástrico, donde está amplificado y/o sobreexpresado y es un marcador de mal pronóstico en cáncer de colon, mama y ovario. Por ello existe un gran interés en el desarrollo de inhibidores frente a CDK8 que pudieran dar lugar a una nueva clase de fármacos anticancerosos que potencialmente aumentaran la eficacia de las terapias antitumorales existente o ser usados como terapias adyuvantes.

Para la identificación y desarrollo de nuevos inhibidores de CDK8 / CDK19 se realizó un cribado de dos librerías seguida de una fase de generación de moléculas activas. Se identificaron 12 series químicas que tras una caracterización multifactorial basada en potencia bioquímica y celular, selectividad y propiedades ADME-T permitió identificar al ETP-749 como la molécula de partida para iniciar una fase de HtL y LO.

La optimización multifactorial del ETP-749 aplicando análisis de relación estructura, propiedades y cinética actividad permitió la identificación de inhibidores duales CDK8 / HASPIN y selectivos CDK8 con potencia bioquímica y celular en el rango nanomolar y alta selectividad frente a otras CDKs. Los inhibidores duales CDK8 / HASPIN presentaron una mayor potencia antiproliferativa respecto a los inhibidores CDK8 selectivos e indujeron muerte celular de una manera dosis dependiente. Las moléculas optimizadas fueron oralmente biodisponibles y se van a realizar estudios de PK/PD y de eficacia en modelos tumorales de ratón para comparar la eficacia y ventana terapéutica de inhibidores duales CDK8 / HASPIN y CDK8selectivos.

Summary

The kinases of the mediator complex CDK8 and CDK19 are cyclin C-dependent kinases that together with CDK7 and CDK9 are part of the group of so-called transcriptional CDKs. They have in common that phosphorylate the terminal CTD domain of RNA polymerase II, thus participating in the regulation of transcription. In addition CDK8 independently of the mediator complex is a histone kinase and the main kinase involved in the phosphorylation of STAT1-Ser727 in response to interferon gamma.

CDK8 has been described as an oncogene in colorectal cancer and gastric cancer, where it is amplified and / or overexpressed and is a marker of poor prognosis in colon, breast and ovarian cancer. Therefore, there is great interest in the development of inhibitors against CDK8 that could give rise to a new class of anticancer drugs that potentially increase the efficacy of existing antitumor therapies or be used as adjuvant therapies.

Two libraries were screened followed by a hit generation phase to identify and develop new CDK8 / CDK19 inhibitors,. Twelve chemical series were identified that after a multifactorial characterization based on biochemical and cellular potency, selectivity and ADME-T properties allowed the identification of ETP-749 as hit to initiate a phase of HtL and LO.

The multifactorial optimization of the ETP-749 using structural activity, properties and kinetics relationship allowed the identification of dual inhibitors CDK8 / HASPIN and selective CDK8 with biochemical and cellular potency in the nanomolar range and high selectivity against other CDKs. The CDK8 / HASPIN dual inhibitors presented a higher antiproliferative potency with respect to the selective CDK8 inhibitors and induced cell death in a dose-dependent manner. The optimized molecules were orally bioavailable and PK/PD and efficacy studies will be performed in mouse tumor models to compare the efficacy and therapeutic window of CDK8 / HASPIN and CDK8 selective dual inhibitors.

1. Introducción.

1.1. El cáncer y su tratamiento.

1.1.1. El Cáncer.

El cáncer es una enfermedad que se produce como consecuencia de la desprogramación de los mecanismos que rigen el crecimiento y la proliferación celular. Las células cancerígenas presentan unas características esenciales en su fisiología celular que las diferencian de las células normales, estas son: autosuficiencia en las señales de crecimiento (es decir, no obedecen a control programado); insensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento; evasión ante los mecanismos que inducen la muerte celular programada (apoptosis); potenciación de una replicación ilimitada; angiogénesis; invasión y por último, metástasis hacia los tejidos (Fig. 1B) [1][2]. Cada uno de estos cambios fisiológicos supone la adquisición de nuevas capacidades durante el desarrollo tumoral y la desconexión con los mecanismos de defensa antitumorales mediante mutaciones que otorgan a la célula maligna ventajas proliferativas (Fig. 1A). Este perfil de malignidad da lugar a nuevas propiedades. Por un lado la reprogramación del metabolismo celular adquiriendo ventajas metabólicas para la proliferación, y por otro, la evasión de los mecanismos inmunológicos de destrucción, (evadiendo la actuación de linfocitos T, B, macrófagos y células asesinas naturales) [3][2]. Estos cambios adicionales en la fisiología celular tumoral producen, como consecuencia, inestabilidad genómica y un alto nivel de mutabilidad que impulsan la progresión tumoral, inflamación, etc (Fig. 1B) [4].

Este perfil de alteraciones en la fisiología celular se produce en todos los tipos de células malignas, aún así, existe heterogeneidad genética entre los diferentes fenotipos malignos, lo cual tiene que ver con la existencia de más de 100 tipos distintos de cáncer, además de los subtipos de tumores y diferentes clones de células malignas dentro de un mismo tumor

(heterogeneidad, inter e intratumoral) dando lugar a la selección de clones resistentes a los fármacos [5][6].

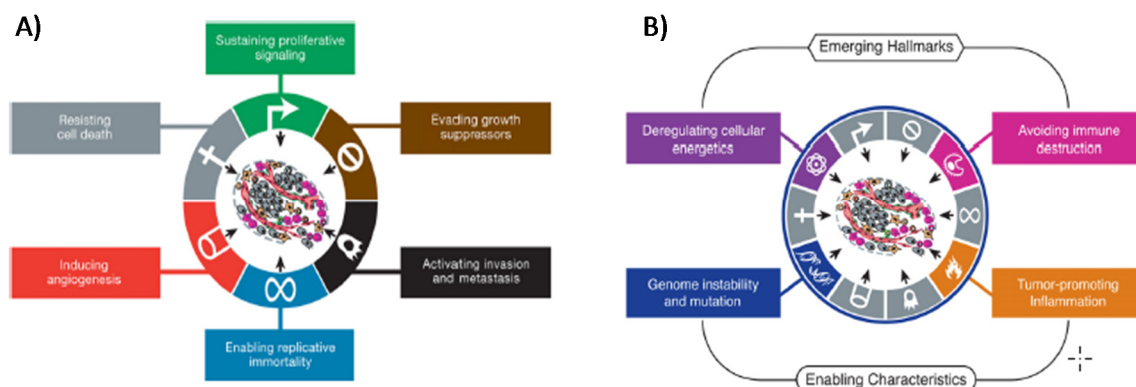


Figura 1. Características distintivas de las células tumorales.

A) Seis características principales de la biología de la célula cancerígena. B) Otras propiedades de la célula tumoral. Hanahan y col. 2000 [2]

1.1.2. Estrategias farmacológicas.

El cáncer fue la segunda causa de muerte en el mundo, en 2015, ocasionó 8,8 millones de fallecimientos (OMS) y uno de cada seis fallecimientos en el mundo se debe a esta enfermedad.

Los cinco tipos de cáncer que causan un mayor número de fallecimientos son los siguientes: pulmonar (1,69 millones), hepático (788000), colorectal (774000), gástrico (754000), mamario (571000) [7], siendo en varones el cáncer de pulmón y de hígado los de mayor mortalidad y en el caso de las mujeres el cáncer de mama seguido del de pulmón (Fig. 2).

Alrededor de un tercio de las muertes por cáncer, se debe a los cinco principales factores de riesgo del ámbito conductual y dietético: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol [8][7].

A estos factores de riesgo, se añaden otros problemas frecuentes, como la detección del cáncer en una fase avanzada, tratamientos poco efectivos y la aparición de resistencia farmacológica.

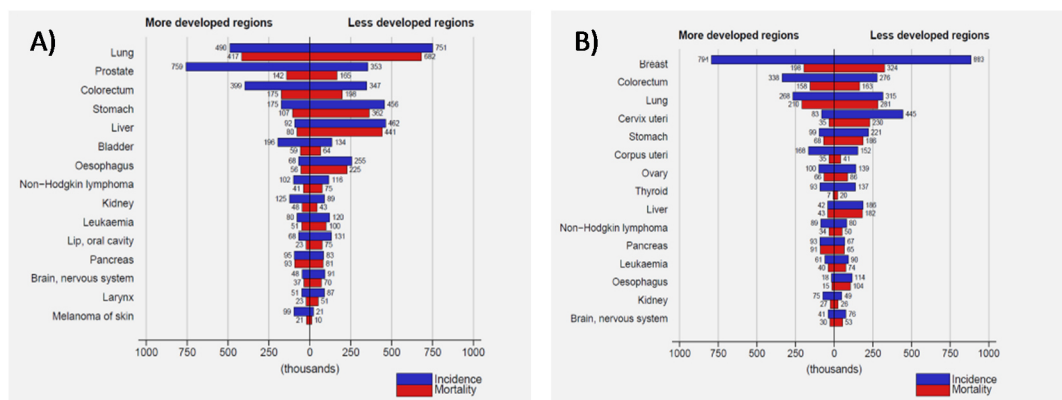


Figura 2. Cifras estimadas (en miles) de la incidencia y mortalidad del cáncer en países desarrollados y menos desarrollados y por sexo.

A) Histograma de la incidencia y mortalidad en varones. B) Histograma de la incidencia y mortalidad en mujeres. Ferlay y col. 2012 [7]

Con respecto a las terapias farmacológicas frente al cáncer, los avances que se han producido en el conocimiento de los diferentes mecanismos moleculares que están desregulados en cáncer han sido en parte gracias el desarrollo de la biología estructural y computacional que están permitiendo realizar un enfoque conceptual diferente en el diseño racional de nuevos agentes antitumorales, respecto al modelo citotóxico preestablecido. Este nuevo enfoque, que se basa en actuar frente a los mecanismos moleculares y bioquímicos de las capacidades desarrolladas por las células tumorales que las hacen diferentes respecto a las normales (Fig. 3) [9], está permitiendo un diseño de agentes más específicos dirigidos, por un lado, hacia las formas mutadas de las quinasas o bien hacia las proteínas sobreexpresadas con el objetivo de eliminar exclusivamente las células tumorales sin dañar a las células normales.

Tal especificidad de acción terapéutica dirigida contra una diana molecular, tiene ventajas, pues la inhibición específica reduce de forma importante los efectos de toxicidad. Pero

presenta también algunas desventajas, como una eficacia modesta y una respuesta transitoria, y las recidivas asociadas a la aparición de resistencias como consecuencia de las estrategias proliferativas que desarrolla la célula cancerígena [1].

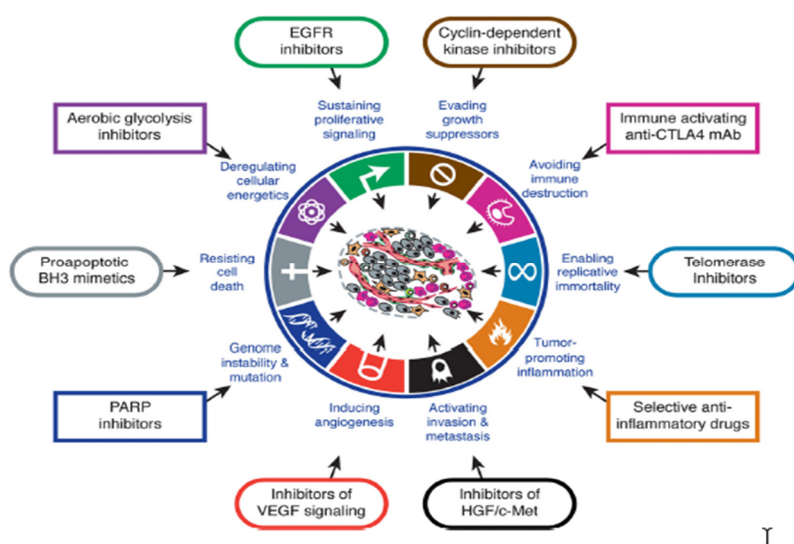


Figura 3. Terapias dirigidas frente a dianas moleculares específicas implicadas en las diferentes capacidades desarrolladas en la progresión del cáncer. Hanahan y col. 2000 [2]

Sin embargo, las estrategias terapéuticas contra dianas concretas que modulan las vías de transducción de señales oncogénicas con múltiples fenotipos malignos en cáncer (proliferación celular, diferenciación, invasión y metástasis, angiogénesis y metabolismo), así como las vías alteradas relacionadas con aspectos del microambiente tumoral (Fig. 3) [9], pueden emplearse tanto como agentes únicos como en combinación con otros fármacos dirigidos a una diana concreta o con fármacos citotóxicos (quimioterapéuticos) [10]. La combinación podría producir efectos antitumorales sinérgicos más potentes y con mejor respuesta terapéutica en relación a su aplicación de forma individual, teniendo además la capacidad potencial de bloquear la inducción de mecanismos de resistencia celular adquiridos, como el desarrollo de clones de células que provocan el crecimiento del tumor con mayor agresividad [11].

Son múltiples las posibilidades de combinación que se pueden plantear, con los más de 250 fármacos aprobados contra el cáncer y más de 1200 en desarrollo [12]. No obstante, las posibilidades se reducen cuando la exigencia hace preciso que la combinación reduzca los efectos adversos acumulativos, y que la respuesta en clínica sea más eficaz que la que aporta cada fármaco de forma individual; ya que, los experimentos de combinaciones de drogas en estudios preclínicos, no siempre predicen su eficacia en clínica, aunque en monoterapias los resultados estén respaldados.

Existen varios casos de combinaciones de agentes con resultados positivos en preclínica, como es el caso de la combinación del gefitinib y trastuzumab en cáncer de mama [13][14] y de erlotinib y bevacizumab en carcinoma de células renales con buena tolerancia pero sin resultados de mejora [15]. Estos casos, a pesar de obtener resultados prometedores en los estudios preclínicos, fracasaron en su totalidad en los ensayos clínicos [16].

Sin embargo, en el caso del cetuximab y bevacizumab en cáncer colorrectal metastásico, tuvo mejor respuesta la terapia combinada, en comparación con los agentes únicos [17]. Por otra parte, la combinación de Nivolumab con Ipilimumab, actualmente en fase clínica III para el tratamiento de melanoma avanzado, demostró mayor eficacia que el tratamiento único de Ipilimumab [18].

Por tanto, las combinaciones de fármacos en base a los resultados en clínica han propiciado reorientar el concepto en el diseño de fármacos dirigidos: "una droga, una diana", hacia una nueva filosofía: "una droga, múltiples dianas"; introduciendo nuevas formas de entender las estrategias terapéuticas asociadas a la polifarmacología [19] [20].

El diseño de fármacos con estas propiedades responde a un único fármaco que actúa sobre varias dianas de una misma vía de señalización alterada que causa la enfermedad o bien un único fármaco que actúa sobre múltiples vías alteradas en dicha enfermedad (Fig. 4) [12].

Otro de los enfoques de las estrategias de la polifarmacología está dirigido a explorar nuevas dianas de fármacos ya existentes en clínica y que actúan sobre dianas ya conocidos (reposicionamiento de fármacos); con la idea de identificar nuevas dianas no detectadas hasta el momento [19]. Estas terapias multidiana tienen, además, la ventaja de poder reducir la aparición de resistencias farmacológicas.

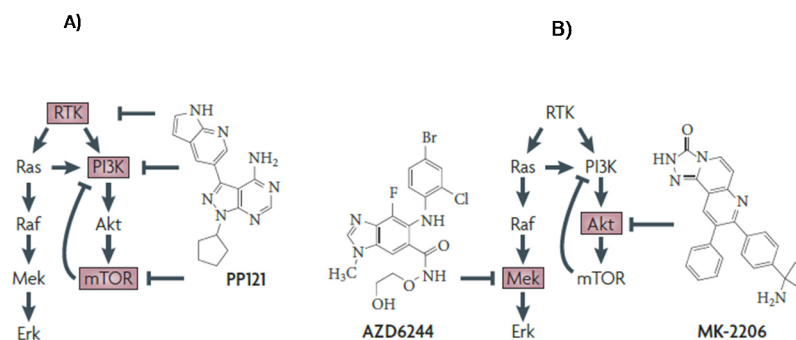


Figura.4. Polifarmacología.

A) El agente único multiobjetivo PP121 es un inhibidor del receptor de tirosina quinasa (RTK) y miembros de la familia PI3K tales como PIK3CA y mTOR. B) La combinación de un inhibidor de MEK, el inhibidor AZD6244 y el inhibidor de AKT MK-2206, se obtiene la inhibición conjunta de las vías de señalización MAPK y PI3K. Knight y col. 2000 [21]

La mayoría de los tumores pueden escapar de la inhibición de cualquier quinasa individual desarrollando resistencia, bien por mutaciones en la diana (quinasa) o de forma alternativa. Los tumores pueden adquirir resistencia a los fármacos a través de mecanismos que no solo implican la mutación de la diana. Estos otros mecanismos incluyen la activación de quinasas sustitutas que reemplazan a las quinasas diana para la que fue diseñada la droga [21] o la inactivación de fosfatasa para aumentar la actividad quinasa residual que persiste durante el tratamiento farmacológico [21].

La superación de estos mecanismos de resistencia moleculares requerirá dirigirse a las células tumorales a múltiples niveles, a través de drogas individuales que se unen a múltiples proteínas de una misma vía de señalización (un fármaco múltiples dianas) (Fig. 4) o las combinaciones de inhibidores de alta selectividad frente a varias dianas [22]. Estas nuevas

estrategias necesitan de la integración multifactorial de diferentes disciplinas, así como redefinir las enfermedades desde una óptica más amplia, considerando las diferentes redes del sistema fisiológico que pueden verse alteradas a la vez [19]. A pesar del progreso en el cambio del enfoque citotóxico, hacia una nueva era de medicina molecular personalizada y dirigida, junto con la combinación de drogas, sigue siendo un reto importante la forma de abordar los problemas interrelacionados con la heterogeneidad genética de los tumores y la resistencia tanto farmacológica, como celular, de los agentes contra el cáncer; además de la reducción de los efectos fuera de la diana [22].

1.1.2.1. Proteínas quinasa como dianas terapéuticas en cáncer.

La gran familia de las proteínas quinasas, son proteínas claves en la regulación de funciones celulares muy importantes en casi todos los aspectos de la biología celular. Estas enzimas participan en vías de transducción de señales extracelulares e intracelulares que regulan una extensa serie de funciones; la apoptosis, la progresión del ciclo celular, la reorganización del citoesqueleto, la diferenciación celular, migración, angiogénesis, el desarrollo embrionario, la respuesta inmune, la función del sistema nervioso y la transcripción entre otras.

Las quinasas son enzimas que catalizan la transferencia del γ -fosfato terminal del ATP a un grupo aceptor hidroxilo de las cadenas laterales de residuos de serina, treonina o tirosina (Ser/Thr o Tyr) de sustratos mayoritariamente de carácter peptídico. Mediante los procesos de fosforilación y también las desfosforilaciones (catalizadas por proteínas fosfatasas) se puede alterar la función de otras proteínas señalizadoras, aumentando o disminuyendo su actividad biológica y regulando funciones celulares claves.

Por tanto, las quinasas juegan un papel crucial en la regulación de los procesos celulares mencionados habida cuenta de que la alteración de sus funciones en las vías de señalización en las que están implicadas, produce una desregulación de estos procesos celulares y puede conducir al desarrollo de fenotipos malignos [23][24][25].

Dada su implicación en el desarrollo de enfermedades degenerativas, en cáncer, en inflamación y en enfermedades inmunológicas, las quinasas han emergido en los últimos años de forma importante como dianas terapéuticas moleculares para la búsqueda de terapias frente a estas enfermedades (Fig. 5) [20].

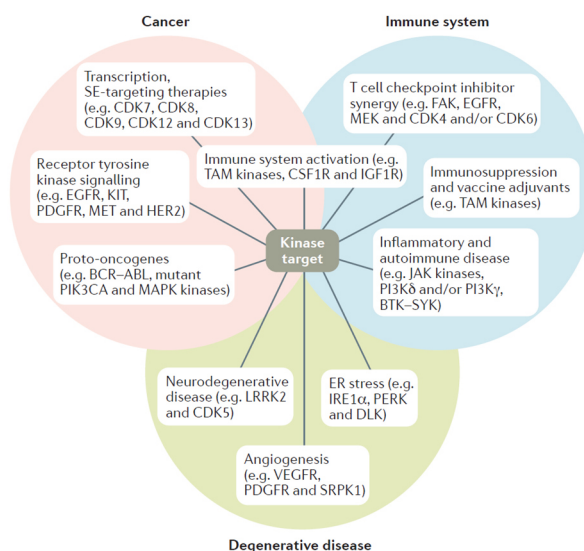


Figura 5. Representación de las diferentes dianas terapéuticas de proteínas quinasas en las diferentes patologías en las que están implicadas. Ferguson y col. 2018 [26]

La secuenciación del genoma humano ha contribuido a la identificación de casi todas las proteínas quinasas de eucariotas (ePK), unas 538 quinasas [27] (alrededor del 1,7% de todos los genes humanos) [28]. De ellas, entorno al 80% de las quinasas identificadas corresponde a la familia de las serín-treonín quinasas (STK) y el resto a tirosina quinasas (TK).

El conjunto de estas enzimas fosforilan hasta un tercio del proteoma [26], pues cada proceso de transducción de señal ocurre a través de una cascada de fosfotransferencias, lo que indica que las quinasas regulan múltiples vías implicadas en muchos procesos biológicos y fisiológicos y por tanto ocupan un espacio terapéutico muy diversificado. Tienen, así mismo, un gran potencial como dianas farmacológicas dado su alto nivel de drogabilidad, tanto en oncología, como en muchas otras áreas terapéuticas [23] [28] [26] (Fig. 5).

Entre el 50 y 70% de los programas para la búsqueda de terapias contra el cáncer se basan en la identificación de inhibidores de proteínas quinasa. [23] Este emergente interés ha dado lugar a que en los últimos años se hayan aprobado por la FDA alrededor de 40 inhibidores de quinasas (principalmente, inhibidores de receptores de tirosinas quinasas) para tratamientos oncológicos (Fig. 6) [29][30]. Los inhibidores de quinasas han revolucionado el tratamiento de algunos tipos de cánceres, como la leucemia mieloide crónica y los tumores del estroma gastrointestinal con eficacia moderada, aumentando la supervivencia del paciente en varios años entre 5-7 [31][32]. En otros casos los inhibidores de quinasas han sido menos efectivos en el tratamiento de los tipos de cáncer que tienen mayor incidencia y tasas de mortalidad más elevadas, como cáncer de pulmón, mama, colorrectal, pancreático y de próstata[7]. La baja efectividad de los inhibidores de quinasas desarrollados para determinados tipos de cáncer se debe a que, la mayoría de los tumores, pueden escapar de la inhibición de las quinasas, desarrollando mecanismos de resistencias para obtener ventajas proliferativas mediante las diferentes estrategias mencionados anteriormente [12][33][34][22].

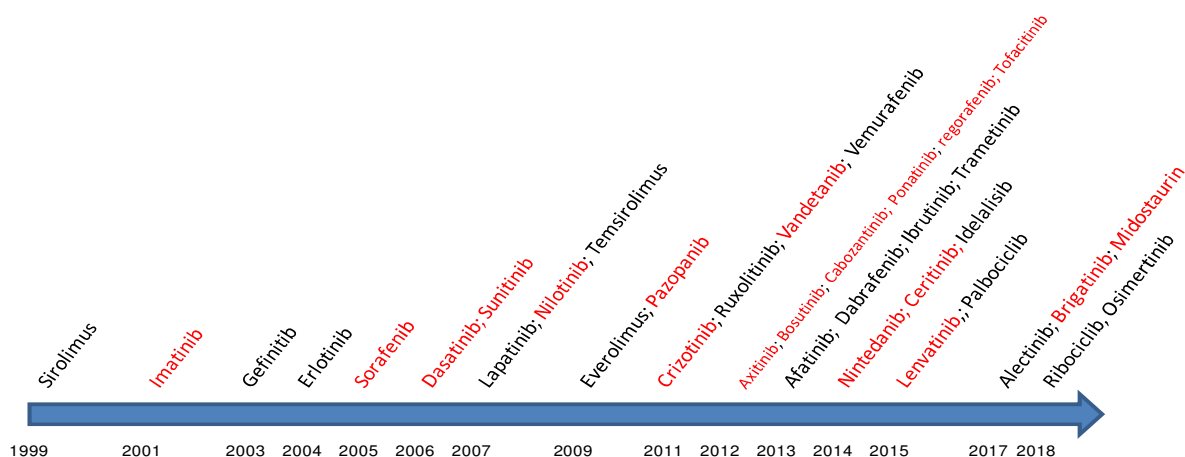


Figura 6. Inhibidores de quinasas aprobados por la FDA en los últimos 30 años. En negro inhibidores para una diana, en rojo inhibidores multidiana. Figura adaptada de Roskoski y col. 2016 [35]

Por otra parte, la estrategia orientada hacia la búsqueda de terapias dirigidas para inhibir los procesos basales como la transcripción, abre una vía esperanzadora [36][37]. Estas terapias pueden resultar ser más específicas pues las células transformadas oncogénicamente son más

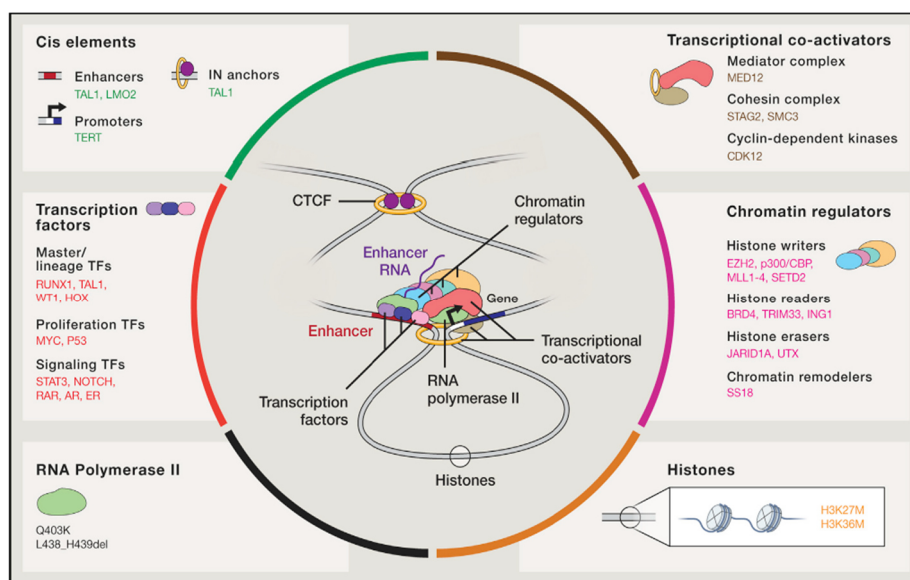


Figura 7. Componentes de la maquinaria del proceso de transcripción alterados en cáncer. Bradner y col. 2017 [37]

En eucariotas, la transcripción de los ARNm que codifican la mayor parte de proteínas depende de la ARNPol II, que contiene un dominio carboxilo terminal (CTD) largo que presenta una región de repeticiones en tándem de una secuencia consenso formada por un heptapéptido (Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser) que se repiten, detectándose desde 26 repeticiones en levadura hasta 52 en mamíferos [40][41].

El dominio CTD se modifica dinámicamente y sirve como lugar para el reclutamiento de enzimas y proteínas reguladoras que están involucradas en la transcripción y el procesamiento del ARNm. Durante la transcripción la ARNPol II, se une a secuencias específicas de los promotores (caja TATA) donde también se unen los factores generales de transcripción, TFII A, B, D, E, F y H de la maquinaria transcripcional [42][43][44].

El CTD se fosforila en sitios específicos necesarios para la iniciación, la elongación y la terminación de la transcripción generando un código regulatorio complejo referido como el código CTD [45]. Las quinasas dependientes de ciclinas transcripcionales, CDK7, CDK8 y CDK9, asociadas a sus correspondientes ciclinas, están implicadas en la fosforilación del CTD [46] [40]. Concretamente, CDK8 puede fosforilar el CTD de ARNPol II en Ser2 y Ser5 regulando, positivamente la transcripción de genes como p53 [47].

En la actualidad, las proteínas quinasas dependientes de ciclinas de la serie transcripcionales, principalmente CDK7, CDK8, CDK9 y CDK12 y CDK13, son dianas farmacológicas en muchos programas de búsqueda de fármacos con resultados esperanzadores.

1.2. CDK8 como diana terapéutica en oncología.

1.2.1. Funciones biológicas de CDK8.

La quinasa dependiente de ciclina (CDK8) es una serín-treonín quinasa que dentro del quionoma humano pertenece a la subfamilia CMGC (CDK, MAPK, GSK y CLK). CDK8 se expresa de forma ubicua. El gen está ubicado en el cromosoma 13 humano en la región 13q12.13–13q12.2 [40].

Su expresión da lugar a una proteína de 464 aminoácidos (53 kDa) [48] [49]. A nivel funcional, forma un heterodimero asociada con ciclina C, subunidad reguladora. Hasta la fecha se han descrito 20 CDKs diferentes y 30 ciclinas. La deficiencia de CDK8 es embriónicamente

letal [50], pero la eliminación condicional de CDK8 en el ratón adulto no tiene efectos relevantes en la viabilidad celular [51].

1.2.1.1 CDK8 como regulador de la transcripción.

CDK8 tiene un papel relevante en la regulación de la transcripción, formando parte del complejo multiproteico denominado mediador. Dicho complejo regula la transcripción a diferentes niveles, en primer lugar actúa como un puente molecular entre los factores de la transcripción, unidos al ADN y la ARNPol II, formando parte del complejo de preiniciación; en segundo lugar, participa en eventos iniciales en la salida de los promotores de la ARNPol II y por último participa en la pausa, elongación de la ARNPol II, así como en el procesamiento co-transcripcional del ARN. Dentro del complejo mediador CDK8 puede actuar como co-activador y como co-represor [52].

En humanos, el complejo mediador está estructurado en 4 módulos: cabeza, medio, cola y módulo quinasa. Estos están constituidos por un conjunto de subunidades un total de 25 en levaduras y 30 en mamíferos [53]. El módulo quinasa a su vez está formado por 4 subunidades proteicas: MED13, MED12, CDK8 o su parólogo CDK19 y ciclina C (CycC) (Fig 8) [42][52], que se asocian de forma reversible al resto del complejo mediador [54][55]. Todas las subunidades tienen parálogos excepto la CycC [53].

Aunque la contribución funcional de cada parólogo del dominio quinasa está todavía por dilucidar, parece que podrían tener diferentes funciones reguladores de la transcripción dentro del complejo mediador.

El dominio quinasa del complejo mediador se ha implicado en funciones biológicas tan diversas como son el desarrollo, la diferenciación celular, la respuesta a factores de crecimiento, la regulación del ciclo celular, la homeostasis energética, la homeostasis de los niveles de oxígeno y la inmunidad innata.

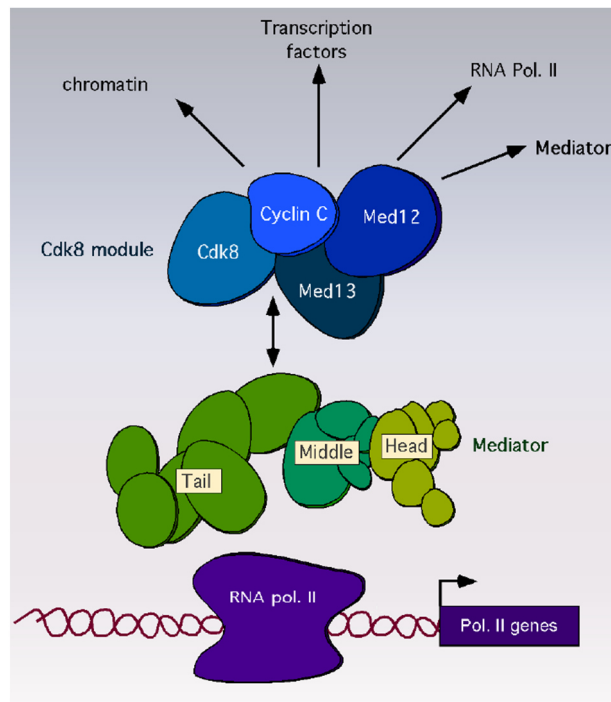


Figura 8. Representación de los diferentes componentes del módulo quinasa dentro del Complejo mediador. Strich y col. 2014 [56]

Como parte del complejo mediador CDK8 puede regular negativamente el inicio de la transcripción a través de la fosforilación de Ciclina H, en la Ser5 y la Ser 304, lo cual hace que CDK7 esté inactiva, y no fosforele al TFIIF, reprimiendo la iniciación de la transcripción de la ARNPol II[57], aunque esto no se ha corroborado in vivo[42]. Además, CDK8 puede reprimir la reiniciación de la transcripción [58].

Por otro lado, CDK8, como parte del complejo mediador, puede actuar como co-activador regulando la elongación de la transcripción de genes específicos de estímulo. Como es el caso de genes de respuesta temprana, el factor de hipoxia inducible 1A, y genes inducidos por el receptor de estrógenos (Fig. 9) [59] [41].

Igualmente, CDK8 puede regular la expresión de genes fosforilando directamente a factores de transcripción y afectando así, directamente, su actividad o induciendo su degradación (Fig. 9). Así, la fosforilación de SMAD (*mothers against decapentaplegic*

homolog) por CDK8 regula, tanto su actividad transcripcional, como su degradación. Estos factores de transcripción regulan, ciclo celular, diferenciación y apoptosis [60].

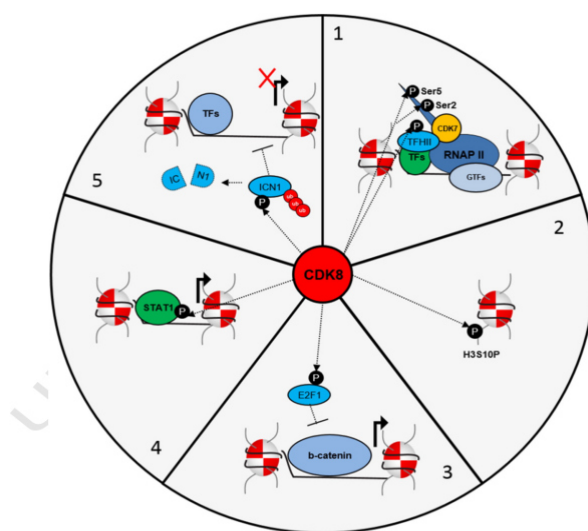


Figura 9. Vías de señalización en las que CDK8 es un efector modulando los niveles de expresión génica dependiendo del contexto.

1) CDK8 fosforila e inactiva a CDK7 y el CTD de la ARNPol II. 2) CDK8 fosforila a H3 y activa la expresión génica. 3) CDK8 fosforila a E2F1 para regular la expresión de genes dependiente de β -CATENINA. 4) CDK8 fosforila a STAT1 para activar la transcripción dependiente de IFN- γ . 5) CDK8 fosforila a NOTCH e induce su ubiquitinación y degradación inhibiendo la expresión de genes dependiente de NOTCH. Rzymiski y col. 2017 [40]

En el caso de NOTCH (*neurogenic locus notch homolog protein*) su fosforilación por CDK8 libera el dominio intracelular de NOTCH que es transcripcionalmente activo y a su vez promueve su degradación, permitiendo así, una regulación más controlada de la señalización de NOTCH, implicada en la comunicación célula-célula, en el desarrollo neuronal y en la diferenciación de células T [61].

STAT1 requiere una doble fosforilación por JAK/STAT y CDK8 para mediar la transcripción en respuesta a INF- γ y con ello, regular una respuesta vírica en toda regla [34]. Y, por último, CDK8 regula la lipogénesis de novo fosforilando al factor de transcripción SREBP-1C (*regulatory element-binding protein 1C*) promoviendo su ubiquitinación y degradación [62]. La transcripción también se puede activar mediante la fosforilación y acetilación de las histonas.

CDK8 fosforila a las Histonas 3 (H3) en la Ser10, lo que favorece la acetilación en la Lys 14 por GCN5L, y de ese manera se activa la expresión de los genes de respuesta inmediata [63][64].

Recientemente, el complejo mediador también se ha caracterizado como un componente funcional de los “superenhancer” que regulan altos niveles de expresión de genes reguladores esenciales de la identidad celular [52].

1.2.1.2. CDK8 como regulador del ciclo celular.

La regulación del ciclo celular es clave para el normal funcionamiento de la división celular en eucariotas y su desregulación es una característica común en cáncer [65]. Las transiciones del ciclo celular de G1/S y G2/M están reguladas por las CDKs, junto con sus correspondientes ciclinas, mediante la fosforilación de sustratos que promueven la progresión del ciclo celular. La progresión del ciclo celular está activada directamente por los complejos CDK4/CycD y CDK6/CycD, la transición G1/S está regulada por CDK2/CycE [66], y la transición G2/M está regulada por los complejos CDK2/ CycA y CDK1/CycA.

Pero, no sólo las CDKs del ciclo, mencionadas anteriormente, contribuyen a la regulación del ciclo celular, sino que también las CDKs transcripcionales juegan un papel. Por ejemplo, CDK7/H/Mat actúa como una quinasa activadora de CDKs (CAK) fosforilando a CDK1/CycB y a CDK2/CycA y E, que participan en la regulación del ciclo en las transiciones G1/S y G2/M [46].

CDK8 dentro del dominio quinasa del complejo mediador, también participa en la regulación del ciclo a diferentes niveles. Por un lado, CDK8, dependiendo del estímulo, actúa como co-activador de la expresión de genes dependientes de p53; entre ellos, el inhibidor de CDK1/2, p21, que regula la transición de G1/S dependiente de p53 [67]. Además, Porter y

colaboradores han descrito que p21 estimula la actividad quinasa de CDK8 generándose así un bucle de retroalimentación positiva entre p21 y CDK8 [68].

También, el módulo quinasa del complejo mediador controla de manera indirecta la transición G1/S, regulando la vía canónica de WNT/ β -CATENINA, que promueve la progresión G1/S induciendo, la expresión de proteínas mitogénicas como son MYC y Cyclina D. El módulo quinasa a través de MED12 interacciona directamente con β -CATENINA permitiendo la acción del complejo mediador en la activación de la transcripción [69]. Además, CDK8 fosforila a E2F1 inhibiendo así su función supresora de la actividad β -CATENINA y, por lo tanto, activando su función transcripcional [70].

Por otro lado, CDK8 se ha implicado en la regulación de la transición G2/M en mamíferos mediante su participación en el eje regulatorio SKP2-macroH2A1(mH2A1)-CDK8 [71][72]. SKP2 permite la transición de G2/M, al menos en parte, formando parte del complejo ubiquitin ligasa que degrada a p27, inhibidor de CDK1, y en parte también, promoviendo la degradación de la mH2A1 que permite la expresión de CDK8 y que a su vez, fosforila a p27 y favorece su degradación por SKP2, controlando y así la transición G2/M.

1.2.1.3. CDK8 como regulador de la inmunidad innata.

Las células asesinas naturales (NK) encabezan la defensa natural contra infecciones virales y células malignas. Las células NK se dirigen y matan las células aberrantes, como las células infectadas por virus y las cancerígenas. [73].

El factor de transcripción STAT1 es importante en las células NK, que proporcionan una defensa inmediata contra las células tumorales y las infectadas por virus. Putz y colaboradores demostraron que la mutación en un solo sitio de fosforilación (STAT1-S727A) aumentaba la citotoxicidad de las células NK contra una serie de líneas de células tumorales (leucemia, melanoma, mama). Además, demostraron en ratones con la serina 727 mutada a

alanina, que fueron significativamente resistentes a la implatación de células de melanoma B16F10, de leucemia v-Abl positivas, y resistentes a la metástasis de la línea de cáncer de mama 4T1. La quinasa responsable de la fosforilación de STAT1-Ser727 es CDK8 y con ello induce la actividad citotóxica de las células NK (Fig. 10) [74].

La inhibición de la fosforilación de STAT1-Ser727 mediada por CDK8 [75] puede representar una estrategia terapéutica para estimular la vigilancia de tumores mediada por células NK. Pudiéndose mejorar el pronóstico del cáncer al aumentar las células NK mediadoras [74].

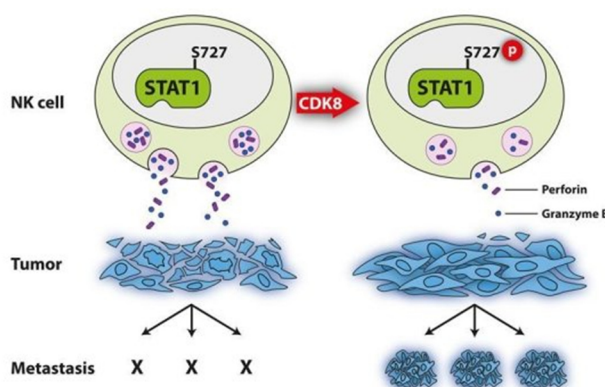


Figura 10. Papel de la inhibición de CDK8 mejorando el tratamiento del cáncer al aumentar la actividad de células NK mediadoras en procesos de respuesta inmune. Topham y col. 2009 [74]

1.2.2. *CDK19 el parálogo de CDK8.*

Como se ha descrito anteriormente, el módulo quinasa que forma parte del complejo Mediador está formado por 4 subunidades proteicas: CDK8, MED12, MED13 y CICLINA C. Todas las subunidades, excepto CICLINA C tienen duplicados sus genes de forma independiente dando lugar a sus respectivos parálogos: CDK19, MED12L y MED13L (Fig. 11) [54].

Aunque la contribución funcional de cada parálogo en el módulo quinasa está todavía por dilucidar, parece que podrían tener diferentes funciones reguladoras de la transcripción dentro del complejo mediador. Además, el módulo quinasa tiene una dinámica de interacción

con sus parálogos de manera permisiva, lo que da lugar a múltiples variantes y mayor especialización funcional del complejo mediador [76]. Análisis estructurales y bioquímicos han resuelto la organización de las subunidades dentro del módulo quinasa y ha revelado una arquitectura molecular evolutivamente conservada.

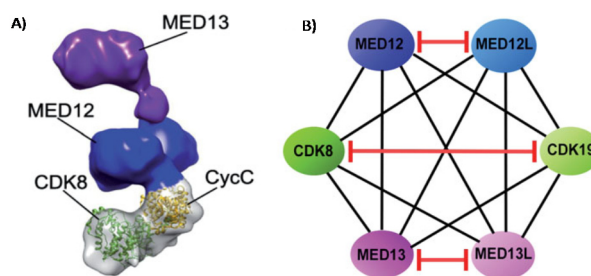


Figura 11. Esquema de la organización del módulo quinasa del complejo mediador.

A) Organización de las diferentes subunidades del módulo quinasa. B) Representación de las interacciones de los parálogos del módulo quinasa. Las líneas rojas representan las interacciones excluyentes y las negras representan las interacciones permitidas. Clark y col. 2015 [54]

CDK8 y su parálogo CDK19 (CDK11) presentan alta similitud con un 91% de homología en las secuencias de las dos proteínas [77]. Ambas proteínas comparten regiones altamente conservadas en sus secuencia como el dominio de unión a la CICLINA C, pero exhiben importantes divergencias en sus dominios C-terminales [78]. El alto grado de homología secuencial sugiere una superposición funcional en los papeles de CDK8 y CDK19. Ambas quinasas pueden fosforilar el CTD de la ARNPol II, a factores de transcripción y a STAT1 con posibles roles superpuestos en la regulación de la transcripción y las diferentes funciones biológicas.[79][34][80][79].

No obstante, a pesar de la alta homología de secuencias, el análisis del perfil de expresión del genoma completo identificó un conjunto de genes regulados de forma única por CDK8 o por CK19 [41][79][81] y diferencias específicas a el nivel de expresión en diferentes tejidos. CDK8 se expresa de forma ubicua en todos los tejidos, mientras que la expresión de

CDK19 está limitada a determinados tejidos como son: próstata, timo, testículos y glándulas salivares [82][83], lo cual induce a pensar que pueden tener papeles homólogos y también papeles diferentes en la regulación de la transcripción [79]. Diferentes estudios de expresión génica revelaron papeles diferentes de las dos proteínas. Los ratones *knockout* de CDK8 presentan letalidad embrionaria temprana, independientemente de la presencia de CDK19, lo que corrobora, según contexto, la independencia de funciones [50]. Por otra parte, la eliminación de CDK8 en células HCT116 desreguló el 65% de genes inducidos en respuesta a hipoxia, mientras que solo el 13% se vio afectado por la delección de CDK19 [41]. Por el contrario, la delección de CDK19 en células HCT116 mostró un efecto más importante sobre la expresión génica en respuesta al estrés por la privación de glucosa que el producido por la eliminación de CDK8. En conjunto, estos estudios indican que CDK8 y CDK19 tiene funciones biológicas superpuestas, pero también específicas según el contexto.

Por otro lado, en células de osteosarcoma, que no expresan de manera natural CDK8 pero si CDK19, la delección de esta última tiene un efecto en proliferación que es independiente de su actividad quinasa. Además, en esta misma línea celular CDK19 regula la expresión de p53 en respuesta a estrés independientemente de su actividad quinasa [84]

1.2.3. Implicaciones de CDK8 en cáncer.

CDK8, en las diferentes vías de señalización en las que se encuentra implicada, actúa como un efector modulando los niveles de expresión génica como co-activador y como co-represor dependiendo del contexto celular. Muchas de estas vías están asociadas a las propiedades distintivas de las células tumorales (Fig. 1) como son el control del ciclo celular, la inmunidad, la homeostásis de oxígeno, energía así como la señalización a través de factores de crecimiento [85][86].

Además, los diferentes componentes del módulo quinasa se han detectado alterados en cáncer y como consecuencia tienen un efecto sobre la actividad quinasa de CDK8 (Fig. 12). De todos estos estudios se deduce que la pérdida o ganancia de la actividad quinasa de CDK8 de una manera contexto-dependiente puede hacer que funcione como oncogén o como un gen supresor de tumores.

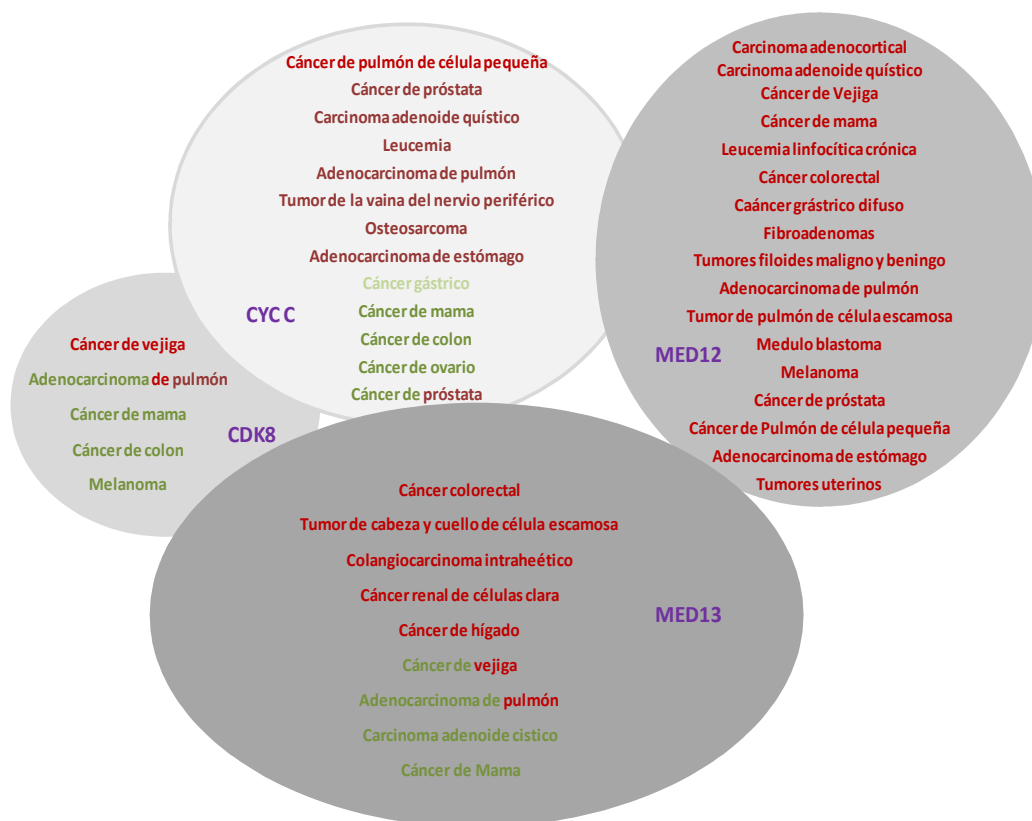


Figura 12. Tumores en los que se han detectado alteraciones en los diferentes componentes del dominio quinasa del complejo Mediador.

En verde oscuro, amplificaciones con sobreexpresión de la proteína. En verde claro, amplificaciones sin sobreexpresión de la proteína. En rojo, mutaciones de la proteína. En marrón, delecciones que implican pérdida de la expresión de la proteína. Clark y col. 2015 [54]

Así, tanto en melanoma como en CCR, CDK8 se ha encontrado sobreexpresado. En el caso CCR la región cromosómica 13q12 esta amplificada [87] [88] [87]. CDK8 funciona como oncogen en CCR, melanoma, leucemia mieloide aguda (LMA) [89], cáncer de próstata y cáncer de mama[90]. Mientras que se ha observado pérdida de actividad de CDK8 y por lo tanto, su

función como gen supresor de tumores, en leiomiomas uterinos, leucemia linfoblástica aguda de células T y en cáncer endometrial[54].

Por otra parte, la actividad oncogénica de CDK8 está apoyada por publicaciones recientes que muestran su implicación en señalización paracrina inducida por quimioterapia en cáncer de colon, mama y ovario [68]. Así, el tratamiento con el inhibidor de CDK8 Senexin A redujo tanto *in vitro* como *in vivo* la supervivencia celular inducida por doxorubicina, un quimioterapéutico que induce daño en el ADN. Se ha observado también, que una elevada expresión de CDK8 correlaciona fuertemente con una baja supervivencia tras recidiva, tanto en pacientes de mama, como de ovario, especialmente tratados con quimioterapéuticos que producen daño en el ADN.

Estos datos apuntan a que la inhibición de CDK8 podría aumentar la eficacia de ciertos quimioterapéuticos.

Así mismo, se ha demostrado que la inhibición genética y farmacológica de CDK8 y CDK19 inhibe la expresión inducida por NF κ B de citoquinas proinflamatorias, que promueven la progresión tumoral, como son IL8, CXCL1 y CXCL2 [91]

Se detallan a continuación los tipos tumorales en los que se ha visto una relación directa con alteraciones en los niveles de CDK8.

1.2.3.1. CDK8 en cáncer colorectal.

El CCR se desarrolla en las células epiteliales del colon como resultado de cambios genéticos y epigenéticos acumulados. La alteración genética más frecuente es la desactivación de gen APC, que es un supresor tumoral que conduce a la activación aberrante de la vía de señalización de WNT. Las alteraciones de esta vía tienen como consecuencia la estabilización y la translocación al núcleo de la proteína β -CATENINA que regula genes implicados en la transformación malignas de células y en el desarrollo de CCR. [87][92][93].

Se ha demostrado que CDK8 se encuentra sobre expresada en el 60% de CCR y la inhibición de CDK8 redujo la proliferación celular en líneas de cáncer de colon demostrándose que la actividad quinasas de CDK8 es importante para la transcripción de genes de la vía WNT/ β -CATENINA y el desarrollo de este tipo de tumores[87][94][69].

Por las implicaciones que tiene CDK8 en relación con la alteración de esta vía se ha propuesto como un oncogén en CCR [36][86][70][69].

Por otra parte, E2F1 es un represor de β -CATENINA. CDK8 ha sido identificado como un represor de E2F1 mediante su fosforilación en Ser 375. Por tanto, CDK8 actúa como co-represor de E2F1 y como activador de β -CATENINA / TCF, promoviendo en ambos casos la activación de la vía oncogénica de WNT/ β -CATENINA. CCT251545 es un inhibidor de CDK8 / CDK19 que ha demostrado inhibir el crecimiento de tumores dependientes de WNT in vivo [95].

También se ha reportado que CDK8 es necesario para mantener las células CCR en un estado indiferenciado, en parte mediado por la regulación de la señalización vía MYC [70][96].

1.2.3.2. CDK8 en cáncer de mama.

Se ha reportado que CDK8 tiene un rol oncogénico en cáncer de mama a través del eje SKP2-mH2A1-CDK8. Como se ha descrito anteriormente, mH2A1 es sustrato del complejo SKP2 SCF, cuya degradación por SKP2 vía ubiquitinación promueve la expresión de CDK8, que regula la expresión de p27, al facilitar su ubiquitinación mediada por SKP2, promoviendo así el crecimiento celular, migración, poliploidía y tumorigénesis.

Por tanto, el eje CDK8-SKP2-macroH2A1 es crítico para estos procesos, y la desregulación de esta vía está asociada con la progresión del cáncer de mama en humanos y la supervivencia del paciente [72].

Aproximadamente el 70% de los tumores de mama humanos expresan receptores de hormonas (HR), que comprende el receptor de estrógeno alfa (ER- α) y / o el receptor de progesterona (PR). El ER es el principal factor de transcripción que impulsa la oncogénesis en el subtipo de cáncer de mama HR-positivo. [97].

McDermott y colaboradores demostraron que CDK8 y su parólogo CDK19, junto con su subunidad reguladora CycC, actúan como mediador de la señalización transcripcional y mitogénica inducida por el ER. Además, la inhibición de CDK8 con inhibidores, con shARN o mediante CRISPR/CAS9 (suprimieron la expresión del gen GREB1 inducido por estrógenos E2) inhibe el crecimiento celular en cáncer de mama ER positivo *in vitro* e *in vivo*, potencia la terapia hormonal (de inhibidores antagonistas como el Fulvestrant) y previene el desarrollo de vías alternativas de proliferación independientes de estrógeno [90][98].

Estos hallazgos identificaron a CDK8 como una diana prometidora a explorar para el tratamiento del cáncer de mama ER positivo [98][99].

Además, CDK8 y CDK19 se han implicado en la transición epitelio-mesénquima (EMT) y la invasión tumoral en diferentes tipos tumorales, entre ellos, un modelo de cáncer de mama murino. Tanto la inhibición genética como farmacológica de CDK8 y CDK19, inhiben la EMT inducida por BMP, inhibiendo la invasión tumoral, la expresión de E-caderina, la localización nuclear de YAP y los cambios de factores de transcripción asociados a EMT.

También se ha establecido una correlación directa, en pacientes, entre CDK8 y factores de transcripción ligados a EMT. Y por lo tanto, de nuevo sitúa a CDK8 y CDK19 como potenciales dianas terapéuticas en cáncer de mama [100].

1.2.3.3. CDK8 en leucemia mieloide aguda (LMA).

CDK8 y CDK19 han sido identificados como reguladores negativos de los genes asociados a *super-enhancer* (SE) en LMA [101]. Los SE son un grupo de elementos

potenciadores que regulan la alta expresión de genes específicos implicados en la identidad, la funcionalidad biológica y el linaje celular.

Los SE oncogénicos fueron identificados por primera vez en células de mieloma múltiple [102][101][103]. EL inhibidor de CDK8 / CDK19 Cortistatin A presentó actividad anti leucémica en células de LMA, mediante la regulación negativa de genes asociados a SE y la activación de genes supresores de tumores. Por otro lado, el inhibidor SEL120-34A inhibió el crecimiento de células LMA regulando la transcripción de STATs y NUP98-HOXA9 [40][75]. Los dos compuestos también han sido eficaces en modelos de *xenograft* de LMA. Estos prometedores datos preclínicos obtenidos con dos compuestos estructuralmente distintos sugieren el desarrollo futuro de inhibidores de CDK8 / CDK19 para la terapia de LMA.

1.2.3.4. CDK8 en melanoma.

Se ha demostrado que CDK8 está implicado en la proliferación de células de melanoma maligno y la progresión tumoral, inducido por la reducción de la expresión de la isoforma de histona macroH2A (mH2A).

La mH2A es una isoforma de histona que suprime el desarrollo de melanoma maligno [104] [105]. La disminución de la expresión de mH2A en células de melanoma con baja malignidad incrementa su proliferación y migración *in vitro* y el desarrollo de metástasis *in vivo*, consistente con el papel supresor de mH2A en la progresión del melanoma maligno.

Por otra parte, se ha demostrado que el incremento de la expresión de CDK8 es una de las causas por las que mH2A se encuentra en niveles bajos en células de melanoma maligno. Esta circunstancia tiene, como consecuencia, ventajas proliferativas inducidas por la pérdida de la función de mH2A. También, se ha visto una correlación inversa entre los niveles de expresión de CDK8 y los niveles de mH2A en muestras de pacientes con melanoma maligno [106][104]. Esta aportación tiene implicaciones importantes para la búsqueda de agentes

1.2.4. Inhibición farmacológica de CDK8.

1.2.4.1 Aspectos generales de las estructuras de las proteínas quinasas eucariotas (ePK).

Las ePK (proteínas quinasas eucariotas) son una superfamilia de proteínas que presentan alta homología estructural a lo largo de la escala evolutiva. Las estructuras cristalográficas de las ePK han revelado la distribución de los dos subdominios o lóbulos que las componen, siendo el más pequeño el lóbulo N-terminal (lóbulo N), compuesto por cinco hojas β y dos α -hélices, denominadas α B y α C, y el lóbulo C-terminal (lóbulo C) de mayor tamaño y formado por α -hélices [107]. Los dos dominios se encuentran conectados a través de la denominada región bisagra o “hinge” (Fig. 13A) [108].

Tanto regiones del lóbulo N-terminal como del lóbulo C-terminal se encuentran implicadas en la catálisis. Éstas son el bolsillo de ATP y otras zonas altamente conservadas y que son características de la familia de las quinasas, como es el caso de la región de activación o bucle de activación, la región bisagra o hinge, y el motivo DFG (triada Asp173-Met174-Gly175 en CDK8) [20].

Se han identificado tres residuos esenciales y altamente conservados para la función catalítica de las ePKs. Una lisina en la región del subdominio II del lóbulo N-terminal implicada directamente en la unión al sustrato, y dos aspárticos, uno en la región catalítica formando parte del motivo DFG, y el otro localizado en el subdominio VIB que actúa como aceptor de protones facilitando la fosfotransferencia durante la reacción catalítica (Fig. 13B). La ausencia o la mutación de estos residuos conllevan la pérdida de la capacidad funcional de fosforilación de la proteína.

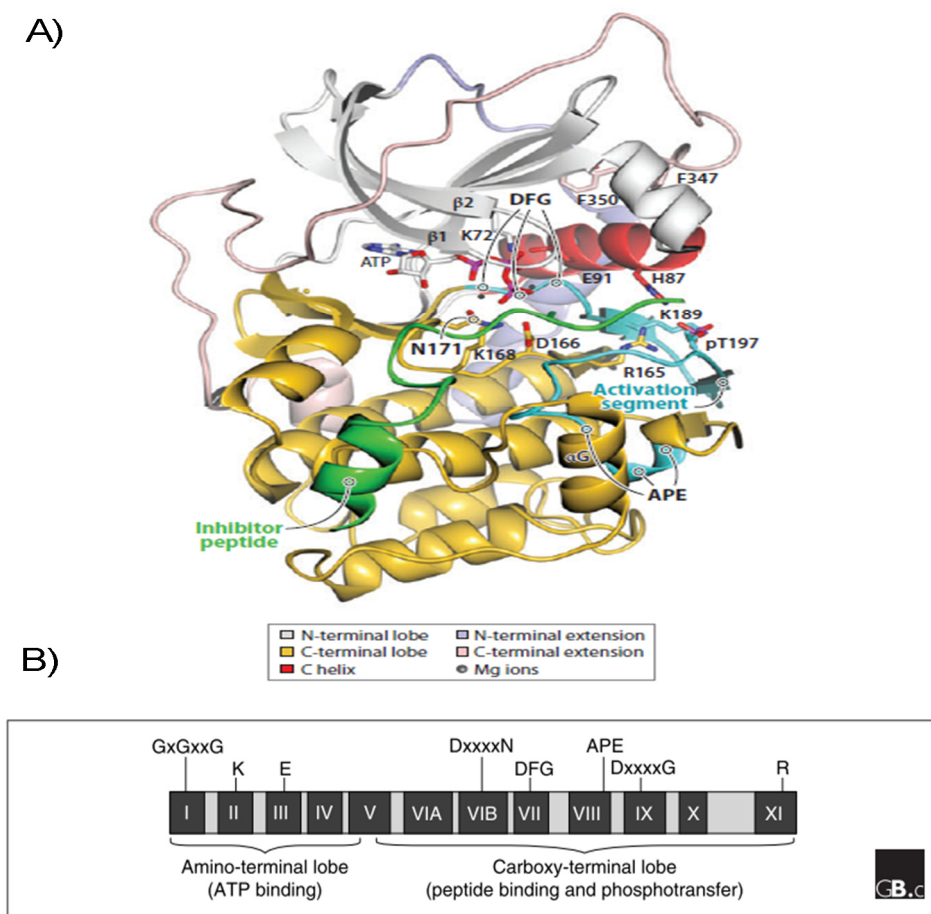


Figura 13. Estructura general de una proteína quinasa unida a una molécula de ATP.

A) Representación de las regiones conservadas del dominio quinasa. B) El dominio catalítico de las ePK. Los 12 subdominios conservados están indicados por números romanos. Las posiciones de los residuos de aminoácidos muy conservados en toda la superfamilia ePK se indican encima de los subdominios, usando el código de aminoácidos de una sola letra. Hanks y col 2003 y Endicott y col. 2012 [109][110]

1.2.4.2. Estructura de las CDKs.

El quinoma humano está formado por 8 subfamilias de quinasas, entre ellas la familia CMGC engloba a 26 serina/ treonina proteína quinasas de la subfamilia de las CDKs y entre ellas CDK8 [111].

Estructuralmente, las CDKs presentan regiones altamente conservadas y con alta homología con respecto a las ePKs. Las CDKs exhiben los dos lóbulos típicos de las quinasas, manteniendo la misma estructura terciaria típica de las ePKs [112]. La hendidura catalítica está rodeada por la región bisagra y descansa entre los dos dominios, aportando ambos residuos esenciales durante la catálisis.

En el dominio C-terminal se encuentra el sitio de activación donde se une el ATP, flanqueado por el motivo DMG (Asp173-Met174-Gly175), altamente conservado entre las CDKs. La conformación del motivo DMG y del α -hélice C son críticos para su activación.[113].

Las diferentes CDKs son similares en términos de secuencia y estructura. Si tomamos como referencia la estructura conocida de CDK2, el rango de identidad de secuencia varía entre el 30 y 70% (Fig. 14) [114]. Las estructuras secundarias están muy bien conservadas y solo se aprecian mínimas diferencias. No obstante, las divergencias encontradas se agrupan en regiones o bucles concretos (β 3- α C, β 4- β 5, α D- α E, α G- α H) y en el segmento de activación también denominado *T-loop* o bucle-T y en posiciones específicas para el reconocimiento de las diferentes proteínas ciclinas necesarias para que adopten su forma activa y cuya interacción se produce a través de las hélices C y B (Fig. 13) [114].

CDK8 posee ciertas características estructurales secundarias que la diferencian, como son la presencia de una cola C-terminal extendida que se encuentra adyacente a la zona bisagra, y de una inserción única que consta de nueve residuos (EDIKTSNP) enfrente de la hélice α G.

CDK7 es la otra CDK que junto con CDK8 tiene un extremo C-terminal extendido, aunque la composición de los residuos de las dos extensiones es diferente (Fig. 14).

La conformación activa de CDK8 se logra tras su unión a Ciclina C, siendo la hélice α C en el dominio N-terminal crucial en el reconocimiento e interacción. También tiene un α hélice adicional, α B, en el extremo N-terminal que ayuda en este propósito, considerándose su contribución fundamental y definiendo la afinidad excepcionalmente alta de CDK8 por Ciclina C debido al incremento de la superficie de contacto entre ambas proteínas.

La formación de un puente salino entre Lys52 y Glu66 ayuda a estabilizar esta conformación activa (Fig. 15) [113]. En contraste con otras CDKs, la conformación activa de CDK8 carece de un residuo fosforilado en el bucle-T. Se cree que la presencia del Glu99 en

Ciclina C actúa aportando el efecto del fosfo-residuo del que carece CDK8, interactuando con las tres argininas conservadas, Arg65 (lóbulo N), Arg150 (lóbulo C) y Arg178 (bucle-T). Estas interacciones pueden impulsar el necesario cambio conformacional para la apertura del sitio de unión al ATP (Fig. 13A).

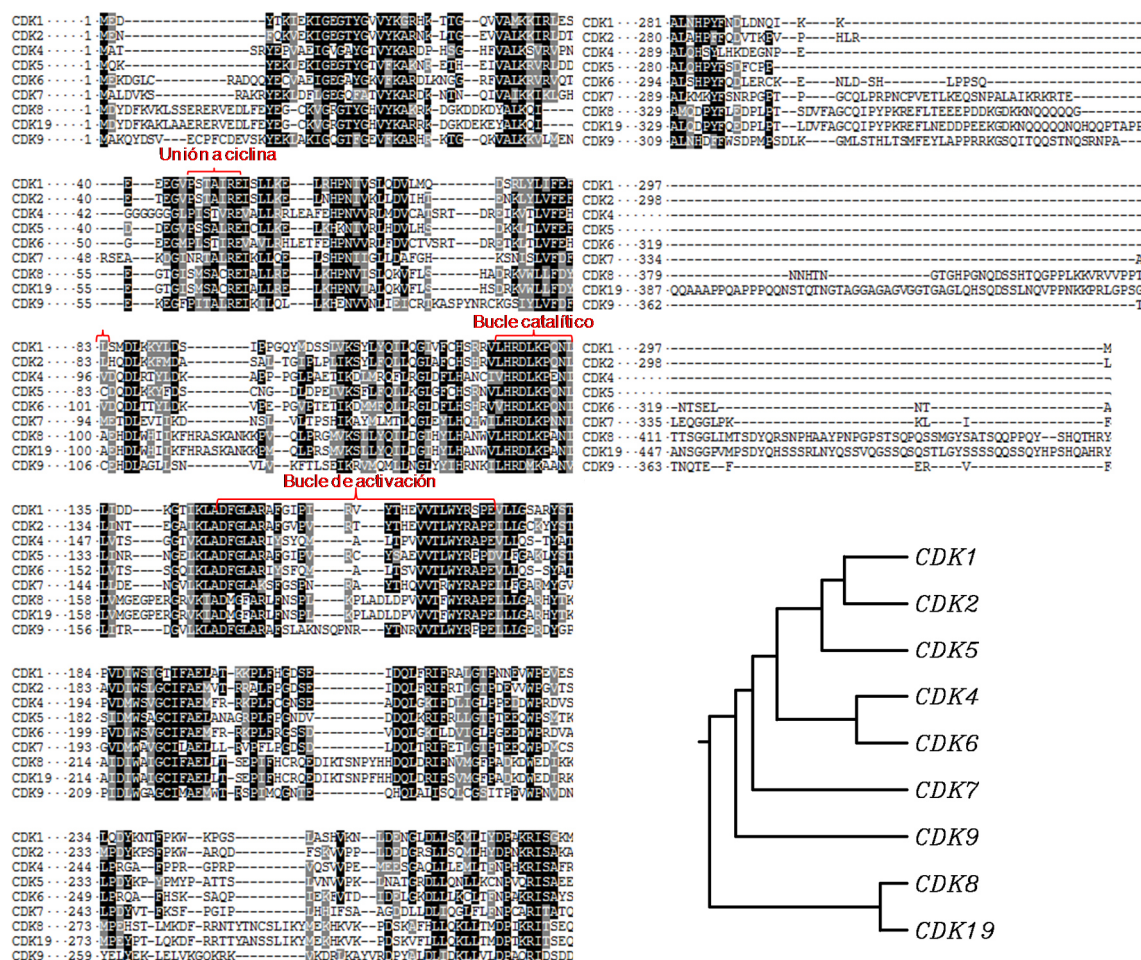


Figura 14. Alineamiento de las secuencias de CDKs y árbol filogenético.

Sombreados en negro los aminoácidos idénticos y en gris los aminoácidos similares Mediante ClustalW, T-Coffee y Bloxshade. Indicadas las secuencias de unión a ciclina, el bucle de activación y el bucle catalítico.

La unión de los otros componentes del complejo mediador, MED12 / MED13 a CDK8 / CICLINA C también puede facilitar que la proteína adopte otras conformaciones. Estudios sobre CDK8 usando la proteína humana recombinante, han revelado que MED12 es necesario para la actividad de esta quinasa, aunque los estudios estructurales muestran que la unión de CDK8 al mediador central se produce a través de MED13 [112]

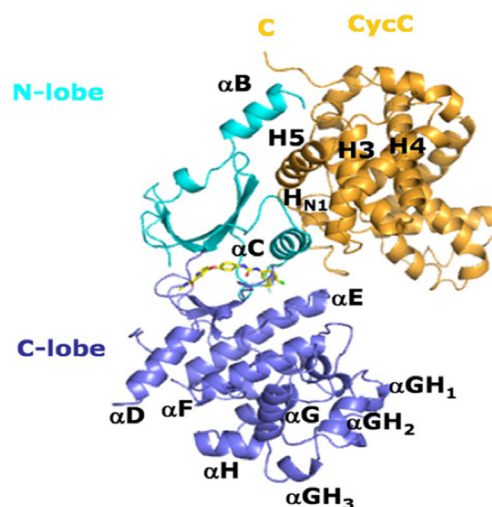


Figura 15. Estructura cristalográfica de CDK8 / CICLINA C. Schneider y col. 2011 [115]

1.2.4.3. Clasificación de los inhibidores de quinasas según su modo de unión.

Los inhibidores de quinasas suelen ser pequeñas moléculas ($PM \leq 500$) que se unen al bolsillo de la molécula de ATP, interaccionando con regiones altamente conservadas como son las regiones de unión al anillo de la adenina, ribosa y fosfato (Fig. 16A). Los inhibidores que se dirigen a este sitio inhiben de forma promiscua múltiples quinasas [116]. Estudios estructurales han identificado dos regiones adyacentes en el bolsillo de unión del ATP que están menos conservadas en la escala evolutiva, el bolsillo hidrofóbico posterior y el bolsillo frontal, lo que facilita el diseño de inhibidores más selectivos (Fig. 16C) [117]

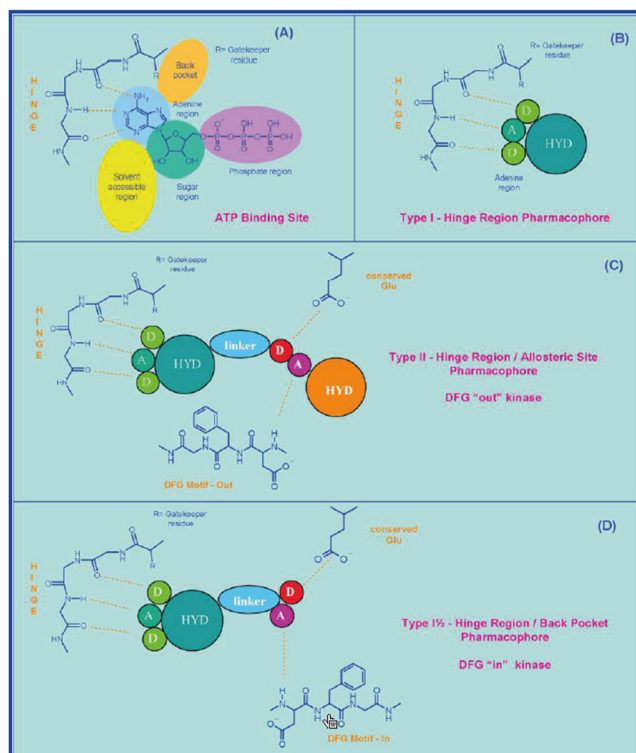


Figura 16. Representación del tipo de inhibidores según su modo de unión.

A) ATP unido al sitio de unión e interaccionando con la región bisagra, los enlaces de hidrógeno se representan con líneas discontinuas naranjas (Hinge). B) Modo de interacción de inhibidores Tipo I (DFG-in) representados los posibles puentes de hidrógeno con la región bisagra. C) Modo de interacción de inhibidores Tipo II, representados los posibles puentes de hidrógeno con la región bisagra y con el sitio alostérico generado por la conformación DFG-out D) Modo de interacción de inhibidores Tipo I^{1/2}, representados los posibles puentes de hidrógeno con la región bisagra y con la cavidad posterior generada por la conformación DFG-in. Los donadores de puente de hidrógeno están representados por círculos etiquetados como D, los aceptores de puente de hidrógeno como círculos etiquetados como A, los círculos más grandes etiquetados como HYD indican los grupos mayoritariamente de naturaleza hidrofóbica que ocupan o bien el lugar de unión del anillo de adenina (verde) o el sitio alostérico (naranja). Zuccotto y col. 2010 [118].

En base a estos conocimientos de la estructura de las quinasas y al modo de interacción los inhibidores desarrollados se han clasificado como inhibidores competitivos de tipo I, tipo II y I^{1/2}[118]. Los inhibidores tipo I se unen al bolsillo de ATP de la quinasa en la forma activa y se caracterizan por que presentan una conformación abierta del bucle de activación. Esta conformación abierta se conoce como DFG "in", en función de la posición de la tríada aspartico-fenilalanina-glicina (DFG) situada en este bucle (Fig. 16B). La característica común de los compuestos tipo I es su capacidad para unirse al sitio del ATP mediante enlaces de hidrógeno

en la región bisagra y mediante interacciones hidrofóbicas en la región de unión del anillo de la adenina del ATP [118].

Los inhibidores tipo II se unen a la conformación inactiva “DGF-out” de la quinasa produciendo un cambio conformacional y topológico en el bolsillo del ATP dando lugar a una conformación cerrada del bucle de activación (DFG "out") [119] [117]. Esta clase de compuestos, definidos como inhibidores de tipo II, se unen a la misma área ocupada por los compuestos de tipo I pero también se extienden al sitio hidrofóbico adicional disponible en la forma inactiva (Fig. 16C) [29]. La diferente posición de los residuos de DFG en la forma "out" da como resultado la apertura de una cavidad adicional, el sitio alostérico, que es de naturaleza hidrofóbica y es donde se dirigen específicamente los compuestos de tipo II.

Los inhibidores tipo $I^{1/2}$ que se han propuesto contienen todos los elementos de interacción de los inhibidores tipo I y II, interaccionando con la región bisagra y con uno de los residuos del DFG en la forma “in” (Fig. 16D) [118] [117]. Los inhibidores ATP no competitivo se clasifican como inhibidores alostéricos, ya que no se unen al bolsillo del ATP, se unen a regiones no conservadas de la quinasa, lo que facilita el diseño de inhibidores más selectivos, más potentes y con mayor tiempo de residencia [120]. Estas ventajas se pueden tomar un paso más allá con inhibidores que se unen covalentemente a sus quinasas.[121] [122] [118].

1.2.4.4. Inhibidores de CDK8 / CDK19.

Recientemente, los inhibidores de CDKs han emergido como una de las terapias más prometedores en oncología. Actualmente tres inhibidores de CDK4/6 han sido aprobados para su uso en pacientes con cáncer de mama metastásico ER+: palbociclib, ribociclib y abemaciclib. Además, más de 45 inhibidores de CDK están en fases clínicas. La mayoría de ellos pan CDKs que inhiben a más de una CDK del ciclo celular o transcripcional.

Las evidencias del papel oncogénico de CDK8 en varios tipos de cáncer han creado un interés por el desarrollo de inhibidores frente a esta oncoproteína. Hasta la fecha se han desarrollado diferentes inhibidores de CDK8 duales CDK8 / CDK19. Como ya se ha indicado anteriormente, el parólogo de CDK8, CDK19, presenta una alta homología de secuencia (un 91% de homología en el dominio quinasa y de interacción con ciclina C) y por tanto un alto grado de similitud estructural con CDK8 [53][28]. Por ello, hasta la fecha no se han desarrollado inhibidores selectivos para CDK8 o CDK19. La biología de CDK19, y su papel en el cáncer, esta menos explorado pero podría ser vital para el éxito de aplicación terapéutica de estos inhibidores duales CDK8 / CDK19 [123].

Actualmente solamente el inhibidor BCD-115 dual CDK8 / CDK19 se encuentra en ensayos clínicos en fase I, en pacientes de cáncer de mama avanzado metastásico, (ER (+) y HER2 negativo (receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano) (NCT03065010)[26][124]. Para este compuesto no se ha desvelado su estructura.

En la Tabla 1 se resumen los inhibidores de CDK8 desarrollados hasta el momento.

La Cortistatin A, un alcaloide esteroideo aislado de la esponja marina *Corticium simplex*, fue el primer compuesto que demostró una alta afinidad por CDK8. Los datos reportados de su estructura cristalográfica indican que es un inhibidor dual CDK8 / CDK19 tipo I. A nivel bioquímico inhibe de forma importante a ROCK1 y ROCK2 aunque no se ha detectado inhibición de estas dianas a nivel celular en la línea MOLM-14 [101] [125], [126]. Modula el biomarcador de CDK8 STAT1-Ser727 tanto *in vitro* como *in vivo* en líneas de LMA. Este compuesto mostró eficacia en xenografts de la línea MV4:11 (LMA) y la línea SET-2 (leucemia megacarioblástica), sin indicios de toxicidad. Por otra parte, demostraron que CDK8 / CDK19 regulaba tanto *in vitro* y como *in vivo* la expresión de genes supresores de tumores y de linaje celular [101].

El inhibidor SEL-120-34A, un triciclobenzimidazol sustituido desarrollado por Selvita. Es un potente inhibidor de CDK8 / CDK19 de tipo I, altamente selectivo frente a CDK 1, 2, 4, 5, 6 y 7 y menos selectivo frente a CDK9 [102]. Este compuesto inhibe la fosforilación de STAT1 en Ser727 y de STAT5 en Ser726 *in vitro*. En estudios *in vivo* de *xenografts* de líneas celulares de LMA, KG-1 y MV4:11, se observó supresión del crecimiento tumoral, sin signos detectables de toxicidad. En dichos tumores, se observó la inhibición de la fosforilación de STAT5 en Ser726 de manera dependiente de la dosis [102].

El derivado de 4-aminoquinazolina, Senexina A es un inhibidor potente de CDK8 / CDK19 de tipo 1. Inicialmente se identificó en un estudio de *HTS* para la identificación de pequeñas moléculas inhibidoras de la transcripción de p21, cuya expresión es inducida por daño en los tejidos del entorno del tumor como efecto colateral de la quimioterapia aplicada en tumores primarios [68]. Posteriormente, este compuesto fue identificado como un inhibidor de la actividad de CDK8 / CDK19 observándose la inhibición de la transcripción vía WNT/ β -CATENINA en células HCT116 y la inducción de EGR1 tras la estimulación con suero en la línea celular HT1080. Además, se observó que Senexina A inhibía las actividades paracrinias promovidas por las células tumorales y fibroblastos normales en respuesta a daño y aumentaba la eficacia de quimioterapéuticos usados en *xenografts* derivado de mezclas de células tumorales y fibroblastos [68] .

La Senexina B, es un compuesto derivado y análogo de Senexina A, obtenido por rediseño y optimización de Senexina A. Presenta una mayor potencia frente a CDK8 / CDK19 (entorno a 10 veces más potente) que la Senexina A [127]. Senexina B además de inhibir a CDK8 / CDK19, también inhibió la proteína quinasa activada por mitogeno 2 (MAP4K2) ctivada por mitógeno 19 (YSK4), aunque en menor grado.

Senexina B, inhibió la transcripción de la vía WNT/ β -CATENINA en células HCT116, del mismo modo que Senexina A. Los resultados de estudios *in vivo* reportados indicaron que

en xenografts de la línea celular A549 (cancer de pulmón humano) y la línea MDA-MB-468 de TNBC (de cáncer de mama triple negativo) el compuesto inhibió el crecimiento tumoral. Este inhibidor en terapia combinada con doxorubicina en xenografts de la línea TNBC mostró respuesta antimetastásica de forma significativa en comparación con la monoterapia con doxorubicina. También, mejoró la respuesta antitumoral en cáncer de mama ER+ con respecto al tratamiento con fulvestrant sin toxicidad aparente [98][128].

La colaboración entre MERCK KGaA y el Cancer Reseach UK ha dado lugar al desarrollo de una batería de inhibidores de CDK8. Principalmente 2 series químicas estructuralmente diferentes piridinas 3,4,5-trisustituidas y 3-metil-1H-pirazolo[3,4-b]piridinas. El inhibidor derivado de la serie de piridinas 3,4,5 trisustituidas conocido por CCT251545 es un potente inhibidor de CDK8 / CDK19 [11]. Fue optimizado mediante un ensayo fenotípico que medía la expresión génica regulada por la vía WNT/ β -CATENINA. Los datos cristalográficos mostraron un mecanismo de inhibición tipo I. CCT251545 reguló ala expresión de genes regulados por WNT, así como la expresión de genes regulados por STAT1. El compuesto inhibió el crecimiento tumoral de tumores dependientes de la vía WNT Los autores establecieron la fosforilación de STAT1 en al S727 como un buen biomarcador de la inhibición de la actividad de CDK8 en células.

Las moléculas más avanzadas de ambas series químicas CCT251921 y MSC2530818[129] [130] junto con las sondas químicas CCT251545 y el compuesto 42 de la referencia[131] fueron utilizadas para evaluar la posible toxicidad de inhibidores de CDK8 [132]. Todos los compuestos de este estudio mostraron selectividad frente a un panel de más de 250 quinasas ensayados a una concentración de 1 μ M. En ensayo celulares mostraron inhibición de la vía de señalización WNT/ β -CATENINA y la modulación de STAT1 en la Ser727 con potencia nanomolar. Ambas series de compuestos no inhibieron la proliferación de líneas celulares de CRC *in vitro*, pero fueron capaces de suprimir modestamente el crecimiento

tumoral en xenografts de líneas de CRC [132]. Los compuestos mostraron signos de toxicidad con una pérdida de peso corporal en ratones y los perfiles toxicológicos en ratas y perros revelaron efectos secundarios en órganos claves como médula ósea, corazón, hígado y pulmones. Esta toxicidad puede atribuirse a patrones de expresión genética alterados que van más allá la vía WNT/ β -CATENINA. De hecho, se descubrió que ambos compuestos afectan la expresión de genes involucrado en el desarrollo óseo, inmunología e inflamación. Dado que en este estudio se utilizaron 2 series químicas diferentes los autores claman una posible toxicidad debida a la inhibición de CDK8 más que a los compuestos, pero habría que hacer estudios similares con otros inhibidores desarrollados por otros grupos.

La optimización de la serie de piridinas 3,4,5-trisustituidas también dio lugar a los derivados disustituidos 1,6-naftiridina y al derivado disustituido de isoquinolina [133]. Ambos tipos de compuestos mostraron alta selectividad frente a CDK8 / CDK19 en ensayos bioquímico e inhibieron potentemente la vía de señalización WNT/ β -CATENINA en ensayos celulares. Además este grupo también trabajó en la optimización de unos inhibidores de HSP90 para acabar obteniendo inhibidores de CDK8 / CDK19 oralmente biodisponibles [134].

También la compañía Genetech ha desarrollado inhibidores de CDK8 / CDK19 una serie de 6-aza-benzotiofenos [135]. Estos inhibidores presentan un modo de unión inusual. Los compuestos 13 y 32 son moléculas optimizadas potentes, altamente selectivas, permeables, que modulan la fosforilación de STAT1 en la línea HCT116 de CCR, pero con una baja actividad antiproliferativa en la misma línea.

La piridinil tetrahydroquinolina BRD6989 es un compuesto que fue identificado en un estudio de *HTS* fenotípico, realizado para la identificación de pequeñas moléculas que mejorasen la producción de interleuquina-10 (IL-10) en células dendríticas activadas [125]. De los hits identificados se realizó un panel de selectividad de 414 quinasas y una de las moléculas resultó ser un inhibidor de CDK8 y CDK19 [125], con una potencia submicromolar frente a

CDK8 (IC₅₀ 200nM). En el ensayo celular con una línea de células dendríticas de médula ósea, el compuesto BRD6989 inhibió la fosforilación de STAT1 en S727 y mejoró la expresión de IL-10, lo que ha sugerido que CDK8 y CDK19 pueden ser reguladores negativos de la expresión de IL-10 y con ello reguladores de la inmunidad innata.

T474 y T418 son dos inhibidores diferentes estructuralmente muy potentes con potencias del orden nanomolar bajo frente a CDK8 / CDK19 [136], [123]. Fueron altamente selectivos a 300nM en un panel de más de 400 quinasas, el “*off target*” más destacado del inhibidor T474 fue HASPIN. Ambos inhibidores modularon los niveles de STAT1-Ser727 en líneas de cáncer de próstata, y inhibieron la proliferación de la línea de cáncer de próstata VCAP tanto *in vitro* como *in vivo*. Este efecto se debió a una transición prematura de G1 a S que conllevó la inducción de una respuesta del daño al ADN y como consecuencia los compuestos indujeron muerte celular de manera dependiente de ATR e independientemente de caspasas [137].

Por otro lado, se han descrito otros inhibidores de CDK8, pero que están todavía en fase de desarrollo. Estos inhibidores se han descubierto mediante cribado de fragmentos y co-cristalización o mediante cribado virtual, los inhibidores identificados han demostrado ser inhibidores en ensayo bioquímicos de CDK8 con moderada actividad celular y por ello requieren todavía mayor optimización[138][139] [140].

JH-VIII-49 y su respectiva molécula bivalente degradadora por reclutamiento de la ubiquitin ligasa E3 Cerebron, JH-XI-10-02, es otro inhibidor y degradador de CDK8 en fase de desarrollo. Estas moléculas tienen un farmacóforo basado en esteroides y son derivados más simplificados de la Corstitanina A. JH-VIII-49 es un inhibidor con potencia nanomolar frente a CDK8 / CDK19 altamente selectivo que inhibe la fosforilación de STAT1-Ser727 en células a 5μM, con menos potencia que la Cortistatin A. JH-XI-10-02 es una molécula bivalente que a la vez que inhibe a CDK8 mediante el reclutamiento de la E3 ligasa induce la degradación de

CDK8 vía proteasoma. Este compuesto puede ser una herramienta útil para estudiar y contrastar la diferencia entre inhibir la actividad bioquímica de CDK8 o degradar completamente la proteína. [141].

Inhibidor	Potencia IC ₅₀ (nM)	Tumor con datos de regresión tumoral <i>in vivo</i>	Selectividad	Fase de desarrollo	Indicación (Cáncer)
BCD-115				clínica	mama ER(+)/HER2(-) TNBC
Cortistatin A	17	LMA	A 10µM en un panel de 387 quinasas sólo inhibe CDK8/CDK19, ROCK1, ROCK2 y HASPIN	pre-clínica	
SEL-120 3A4	4	LMA	Selectividad frente a CDK1,2,4,5,6 Y 7	pre-clínica	
Senexina A	280	Pulmón. Inhibe el efecto paracrino de doxorubicina	NA	pre-clínica	
Senexina B	24	Mama y próstata	A 2µM en un panel de 491 quinasas inhibió sólo a MAP4K2 y YSK4.	pre-clínica	
CCT251545	5	CCR	A 1µM en un panel de 291 quinasas sólo inhibió a GSK 3α/β. A 10µM selectivo en un panel de 55 receptores.	pre-clínica	
CCT251921	2,3	CCR	A 1µM selectivo frente a panel de 279 quinasas. A 10µM selectivo en un panel de 55 receptores.	pre-clínica	
Derivado 3-metil-1H-pirazolo[3,4-b]piridina	4,4	CCR	A 1µM selectivo en un panel de 264 quinasas sólo inhibió GSK3α. A 10µM en un panel de 55 receptores sólo inhibió al transportador de dopamina.	pre-clínica	
Derivado 1,6-Naftiridina	5,1	NA	A 1µM selectivo en un panel de 264 quinasas	pre-clínica	
Derivado Isoquinolina	32,7	NA	A 1µM selectivo en un panel de 307 quinasas	pre-clínica	
Derivado 3-Benzilindazol	53	NA	A 1µM en un panel de 307 quinasas sólo inhibe PSK	pre-clínica	
Derivado 6-Azabenzotiofeno	1,5	NA	NA	pre-clínica	
BRD6989	200	NA	A 1µM o en un panel de 414 quinasas sólo inhibió PI3KC2A and PI3KCG	En desarrollo	
T-474 y T-418	1,6/23	Próstata	A 300nM en un panel de 400 quinasas sólo inhibió HASPIN	pre-clínica	

Tabla 1. Inhibidores de CDK8 / CDK19 desarrollados hasta la fecha, los cuales se encuentran en diferentes fases de desarrollo.

NA: no adquirido Tabla adaptada de [124]

Los inhibidores anteriormente descritos son de tipo I es decir, se unen a CDK8 de forma competitiva con el ATP, uniéndose a la conformación activa de la proteína DFG “in”. Los inhibidores tipo II como ya se ha explicado en el apartado 1.2.4.3 se unen a la conformación inactiva DGF “out” de la quinasa produciendo un cambio conformacional y un cambio en la topología del bolsillo del ATP dando lugar a una conformación cerrada del bucle de activación DFG "out" [119] [117]. Esta clase de compuestos, se une a la misma región ocupada por los compuestos de tipo I pero también se extiende al sitio hidrofóbico adicional disponible en la

forma inactiva (Fig. 18C) [29]. Un ejemplo de este tipo de compuestos que inhiben a la conformación inactiva de CDK8 / CDK19 son el Sorafenib [115][142], ponatinib [143] y linifanib [144][145]. Sin embargo, la potencia bioquímica de estos compuestos no se ha visto correlacionada con la inhibición de la vía de WNT/ β -CATENINA, ni con la modulación de la fosforilación del biomarcador de STAT1-Ser727, por tanto la respuesta observada en los ensayos celulares no fue significativa. El Sorafenib, ha sido usado como farmacóforo para el desarrollo de inhibidores tipo II [146][147]. Entre ellos son los derivados de pirrolidina urea [147] los cuales inhiben potentemente a CDK8 en ensayos bioquímicos, pero no muestran actividad significativa de la inhibición de la fosforilación del biomarcador STAT1-Ser727 en la línea celular HCT116 (EC_{50} del orden de μ M alto). También, se ha visto que inhibidores aprobados en clínica para otras dianas son a su vez inhibidores tipo II para CDK8. Estos inhibidores inhiben potentemente a CDK8 en ensayos bioquímicos, pero no muestran modulación del biomarcador STAT1-Ser727 en células HCT116. Una posible explicación a la falta de correlación de los datos bioquímicos y celulares y la pobre traducción de la potencia bioquímica *in vitro* respecto a la actividad observada en el ensayo celular con este tipo de inhibidores, es que puede deberse al hecho de que se dirigen a la forma inactiva de CDK8 y es poco accesible en las células debido a que CDK8 se encuentra formando un complejo proteico, junto con las proteínas que conforman el modulo quinasa en el complejo mediador en su conformación activa [95][147][144][146].

1.3. HASPIN como diana terapéutica en oncología.

La división celular es un proceso altamente regulado y errores en su regulación pueden llevar a inestabilidad genómica y aneuploidía, contribuyendo a la generación de cáncer y defectos de nacimiento.[148].

El conocimiento de los mecanismos moleculares reguladores es fundamental para el diseño de estrategias terapéuticas orientadas a corregir y revertir estos procesos moleculares cuando están alterados: El punto de control del ensamblaje del huso (“*spindle assembly checkpoint*”) o SAC vigila y sincroniza la separación de las cromátidas, la correcta orientación de los cromosomas y su segregación hacia los polos hasta la división de la célula madre en dos células hijas idénticas.

Un grupo de proteínas mitóticas son claves para organizar estos procesos mediante sus actividades en la fase de la división de los cromosomas: la proteína quinasa dependiente de ciclinas CDK1/CICLINA B, proteínas quinasas de la familia de AURORA A, B y C, PLK1 (“*Polo-like Kinase*”), SURVIVINA y la proteína quinasa HASPIN. Entre otras funciones, fosforilan proteínas de la cromatina y de los componentes del huso, regulando de esta forma los diferentes eventos de la división celular y señalizando los diversos puntos de control críticos en el proceso de división mitótica. HASPIN es una quinasa descubierta recientemente que fosforila a la Histona 3 en la Thr3 (H3-Thr3) durante la mitosis y desempeña un papel relevante en la regulación del proceso de división de los cromosomas durante la división celular[149][150][151].

1.3.1. Funciones biológicas de HASPIN.

HASPIN (proteína quinasa nuclear específica de las células germinales haploides), también es conocida como GSG2, (proteína 2 del gen 2 específico de las células germinales). HASPIN es una serín/treonín quinasa mitótica, atípica divergente que presenta baja similitud

de secuencias con otras proteínas ePK. Se encuentra fuertemente sobreexpresada en células germinales masculinas y se ha detectado en timo, médula ósea e hígado fetal y más débilmente, en bazo, intestino, pulmón y una variedad de tejidos fetales [152]. HASPIN se expresa constitutivamente a lo largo del ciclo celular, pero se encuentra altamente fosforilada durante la mitosis.

Básicamente, fosforila a H3-Thr3 durante la mitosis y en la meiosis. También se ha demostrado que HASPIN fosforila a la macroHistona2A1 (mH2A1) en la Ser137. Proteína que controla la fosforilación de la Ser10 y la Thr3 de la Histona H3 en células humanas y está involucrada en el control de la condensación de la cromatina [153][154]. HASPIN está implicada junto con un amplio conjunto de proteínas mitóticas (CDK1/CICLINA B, SURVIVINA, PIM, AURORA B/C, NEK, BUB1, MPS1, PLK1, WAPL, entre otras), en los mecanismos moleculares que regulan la división de las cromátidas durante la mitosis. [150] [155] y tiene una implicación específica en la estabilización y anclaje del complejo microtúbulo-cinetocoro al huso mitótico. HASPIN tiene un papel destacado en estos mecanismos moleculares a través de la fosforilación de H3-Thr3. HASPIN está considerada como una nueva histona quinasa y está incluida en el grupo selecto de quinasas integradas en la regulación de la división del cromosoma y la regulación del huso durante la mitosis y la meiosis. Por tanto, HASPIN tiene un papel importante en los mecanismos de regulación de la mitosis proporcionando una conexión entre las vías de fosforilación mitótica y las modificaciones de la cromatina por su papel epigenético como fosfo histona [150].

La actividad de HASPIN parece estar regulada por tres vías según el momento en mitosis[156]. El dominio N -terminal de HASPIN tiene varios sitios de fosforilación que regulan por un lado, su localización en el núcleo y por otro su actividad quinasa [157]. HASPIN durante la interfase está autoinhibida. La recuperación de la actividad quinasa de HASPIN se

produce cuando es fosforilada en el dominio N- terminal por CDK1-Cyclina B, dando lugar al reclutamiento de PLK1 que también fosforila a HASPIN (Fig. 17A).

Por otra parte, la actividad quinasas de HASPIN cataliza la fosforilación de H3-Thr3 proporcionando un sitio de unión en la cromatina para el reclutamiento del CPC (del inglés “Chromosomal Passenger Complex”) en los centrómeros [156][158]. Lo cual da lugar a la acumulación del CPC en los centrómeros y esta señal molecular a su vez promueve la desfosforilación de HASPIN por el complejo fosfatasa Repo-Man/PP1 (Fig. 17B).y por tanto regula la actividad quinasas de HASPIN por esta otra vía.

La tercera vía de fosforilación de HASPIN es a través de la vía que implica la fosforilación de la histona H2A en la Thr120 por BUB1, que da lugar al reclutamiento de las proteínas del CPC en el centrómero y a su vez la fosforilación de HASPIN, regulando así su actividad quinasas. (Fig. 19C) [156][152].

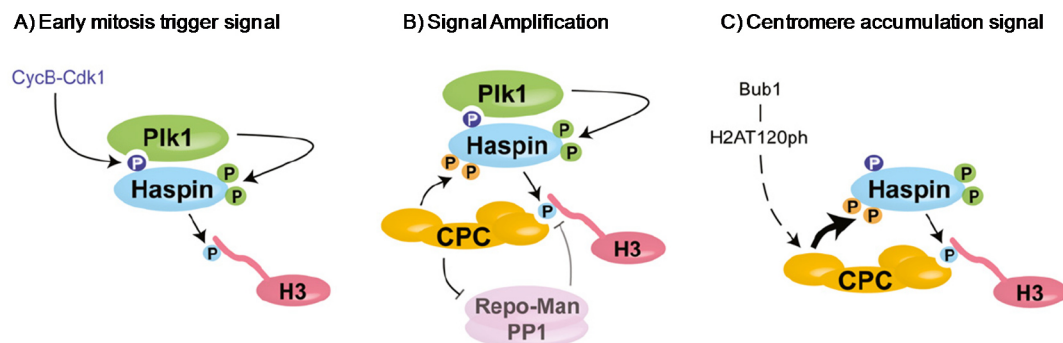


Figura 17. Diferentes vías que regulan la actividad de HASPIN y la fosforilación de H3-Thr3, en diferentes momentos del ciclo celular. Zhou y col. 2014 [156]

1.3.1.1. HASPIN como quinasas mitóticas.

La delección de HASPIN reduce la fosforilación de H3-Thr3 y provoca severos problemas en el alineamiento de los cromosomas, la desorganización del huso mitótico, el deterioro de la cohesión centromérica y la separación prematura de las cromátidas hermanas. Por tanto, HASPIN juega un papel importante en la regulación molecular de estos eventos [159].

El CPC es un complejo de cuatro subunidades principales: AURORA B quinasa, SURVIVINA, BOREALINA y INCENP. AURORA B es una quinasa esencial que regula la progresión mitótica incluido el punto de control del ensamblaje del huso, la condensación de la cromatina, la biorientación cromosómica y la citocinesis [160][161][162]. Se sabe que la fosforilación de H3-Thr3 es crucial para el reclutamiento de AURORA B al centrómero y para su activación. H3-Thr3 es reconocida por uno de los componentes del complejo CPC, SURVIVINA. Esta unión produce el reclutamiento del CPC al centrómero y la activación de AURORA B, que estabiliza la unión de los microtúbulos al cinetocoro [163][160][164][150][165]. Además, AURORA B fosforila a HASPIN en varios residuos de su dominio N-terminal y permiten su activación dando lugar a un ciclo de retroalimentación positiva que da lugar la acumulación del complejo CPC en los centrómeros [149] (Fig. 18).

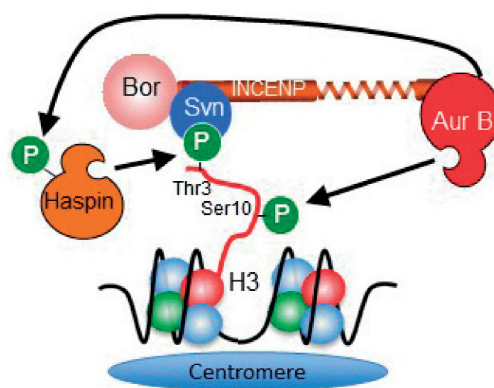


Figura 18. Representación esquemática del ciclo de retroalimentación positiva HASPIN-AURORA B en el reclutamiento de CPC al centrómero. Feizbakhsh y col. 2017 [166]

HASPIN juega un papel importante en el mantenimiento de la cohesión centromérica en mitosis a través de la vía WAPI-YSR. En células somáticas de vertebrados, las cohesinas, están formadas por las proteínas SMC1, SMC3, RAD21 y SA1 o SA2 y factores adicionales PDS5B, WAPI y SORORIN que modulan su asociación dinámica con la cromatina [167]. Zhou y colaboradores demostraron que la unión de HASPIN con PDS5B inhibe la unión de WAPI,

evitando una prematura liberación de las moléculas de cohesina de los centrómeros estabilizando la unión de las cromátidas hasta el momento crítico de la separación [168].

1.3.1.3. HASPIN como quinasa epigenética.

HASPIN fosforila a la histona mH2A en la Ser137. Esta fosforilación podría regular las interacciones de la histona mH2A y el ADN. La mH2A constituye una importante marca epigenética implicada en la regulación de los programas de expresión génica durante la diferenciación celular en vertebrados [105]. En general, se sugiere que la actividad de HASPIN puede afectar al estado de fosforilación de las proteínas implicadas en la regulación de la expresión génica y el “splicing” [105].

Por otra parte HASPIN a través de la fosforilación de la H3-Thr3, puede influir en la activación de enzimas modificadoras de histonas que conforman el código de histona (acetilaciones, metilaciones, fosforilaciones) que son señales o marcas moleculares epigenéticas para la regulación de funciones celulares y la expresión de genes.

1.3.2. Implicaciones de HASPIN en cáncer.

HASPIN, como ya se ha descrito, junto con otras quinasas mitóticas con las que interacciona (CDK1/CICLINA B, AURORA B/A, PLK1, 2 y 3 entre otras) forman parte del grupo de proteínas que participan en la regulación de los diferentes eventos que se desarrollan durante la división celular. Estas proteínas señalizan en los diferentes puntos de control del ciclo, induciendo su detención en respuesta a la defectos o alteraciones que pueden producirse durante la replicación del ADN y otras fases del proceso mitótico [169].

Los puntos de control mitótico, que regulan el ensamblaje del eje de división (SAC) son responsables de la formación de células hijas genéticamente idénticas y garantes de una segregación cromosómica correcta. Estos puntos de control son esenciales para reducir la inestabilidad genómica durante la progresión del ciclo de las células normales. La pérdida del

control del ciclo, es un sello distintivo del cáncer humano. HASPIN tiene un papel importante en estos eventos, participando en la maquinaria molecular que garantiza el proceso de cohesión y alineación cromosómica en profase y metafase y dando lugar a la división de las cromátidas de forma fidedigna y la progresión del ciclo celular [165][155].

Se sabe que la delección de HASPIN da lugar a una mitosis defectuosa y que su inhibición impide la alineación cromosómica normal en metafase, la pérdida de cohesión de las cromátidas y la detención de la mitosis en un estado parecido a prometafase [163].

HASPIN está sobreexpresa en Linfomas humanos como el Linfoma de Burkitt y la Leucemia linfocítica crónica [170] [171].

HASPIN fue identificada junto con PLK1 en un cribado de ARNi frente a 720 quinasas, como una de las principales quinasas, cuyo silenciamiento disminuyó la viabilidad celular y la actividad transcripcional del receptor de estrógenos en células de cáncer de mama MCF7 y HCC1428 [172]. HASPIN también ha sido identificada como la quinasa que más aumenta su expresión tras el doble tratamiento con FGF2 y Gefinitib, un inhibidor de EGFR, de las células A431 de cáncer de cérvix. Y el cotratamiento con el inhibidor de HASPIN-i, CHR6494 (aunque su selectividad está comprometida como se detallará más adelante), resultó ser más efectivo que los tratamientos individuales [173]. Además, el inhibidor de HASPIN CHR6494 ha mostrado actividad antitumoral en xenograft de ratón, pero dada su selectividad comprometida estos resultados se deben tomar con cautela pues parte de los efectos observados pueden deberse a las otras dianas a las que inhibe. [174].

Estos hallazgos han convertido a esta quinasa en una diana relevante para el diseño de terapias contra el cáncer. HASPIN ha sido propuesta como una diana emergente para la búsqueda de fármacos antimitóticos, con mayor éxito en clínica que los existentes, por las características singulares que presenta esta quinasa respecto a otras ePK entre ellas la selectividad de su sustrato.

1.3.3. Inhibición farmacológica de HASPIN.

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, la pérdida del control normal del ciclo celular es un sello distintivo del cáncer humano. Las células tumorales acumulan alteraciones que dan como resultado la proliferación descontrolada e inestabilidad genómica por fallos moleculares en los diferentes puntos de control mitótico, lo cual ha dado lugar al estudio de numerosas estrategias terapéuticas en cáncer con diferentes dianas.

Sin embargo, en general, las drogas antimitóticas no han mostrado en clínica una buena respuesta específica contra las células cancerígenas, tampoco han mostrado el índice terapéutico requerido para lograr una respuesta terapéutica eficaz con un bajo efecto citotóxico en células normales. A estos problemas se añade la aparición de resistencias farmacológicas que implican la salida de mitosis [175] [152]. Por ello, las terapias de última generación antimitóticas se han orientado hacia características del ciclo celular que son distintivas y exclusivas de la población de células tumorales [176], así como a matar a las células arrestadas en mitosis.

Durante décadas se han empleado terapias antiproliferativas dirigidas contra la dinámica de microtúbulos (en inglés “*Microtubule-targeting agents*” o MATs) con respuestas muy positivas en cáncer de mama, ovario y pulmón, pero poco selectivas y con importantes efectos adversos como neurotoxicidad, inmunosupresión, entre otros [176].

Otras dianas para las que se han desarrollado terapias antimitóticas son: las CDKs denominadas de ciclo (ver apartado 1.2.4.2); AURORA A, B y C para las que se han probado más de 30 inhibidores en clínica con muy baja respuesta tanto en tumores sólidos como en neoplasias hematológicas [177]; PLK1, cuyos inhibidores han mostrado muy baja eficacia en clínica como agentes únicos, causando efectos secundarios graves (neutropenia y leucopenia) y en combinación con otros fármacos mostraron respuestas parciales. Solo el inhibidor de PLK1 BI6727 mostró un prometedor beneficio terapéutico en pacientes con LMA [178].

Como se ha comentado HASPIN tiene papeles importantes a través de la fosforilación de H3-Thr3 en el control de la actividad de Aurora B y el reclutamiento al centrómero de proteínas del complejo CPC a través de SURVIVINA, regula la cohesión de los cromosomas, la alineación en los polos del huso en metafase y la progresión del ciclo[150]. Por ello, HASPIN es una de las dianas emergentes dentro de las nuevas terapias dirigidas frente a la inestabilidad genómica y los puntos de control del ensamblaje del huso en mitosis (“*Spindle assembly checkpoint*” o SAC) que se podría combinar con los antimitóticos clásicos para favorecer la muerte de las células arrestadas en mitosis.

1.3.3.1. Estructura de HASPIN.

HASPIN pertenece a la familia de las proteínas quinasas de eucariotas (ePK) del tipo serina/treonina aunque está considerada como una quinasa atípica [179], pues mantiene secuencias divergentes con respecto a las ePK [157]. Durante mucho tiempo fue considerada una pseudoquinasa inactiva debido al bajo grado de homología estructural que presenta con respecto a las proteínas quinasas típicas. Otra característica atípica es que su dominio quinasa no requiere estar fosforilado para su activación y tiene una muy alta especificidad y selectividad por su sustrato.

Las diferencias estructurales encontradas se localizan fundamentalmente en el dominio catalítico. HASPIN está formada por una estructura bilobulada donde se distingue un lóbulo N-terminal simple desplegado y con pocas secuencias conservadas y un lóbulo C-terminal, similar al de las ePK, pero con cambios estructurales significativos que incluyen una serie de insertos específicos que no tienen otras ePK [148][151][180] (Fig. 19). Entre los dos lóbulos se encuentra una hendidura catalítica que contiene los residuos implicados en la catálisis, bien conservados a pesar de la baja homología de secuencia. Estos residuos están implicados en la unión a magnesio y nucleótidos[179]. El segmento de activación de HASPIN difiere marcadamente de aquellos encontrados en otras ePK.

La actividad de las ePK está regulada en general por fosforilaciones en el segmento de activación, ubicado en el lóbulo C, y contiene un sitio de unión a Mg^{+2} , el motivo DFG, el bucle de activación y el bucle-P que cubre la entrada al centro catalítico.

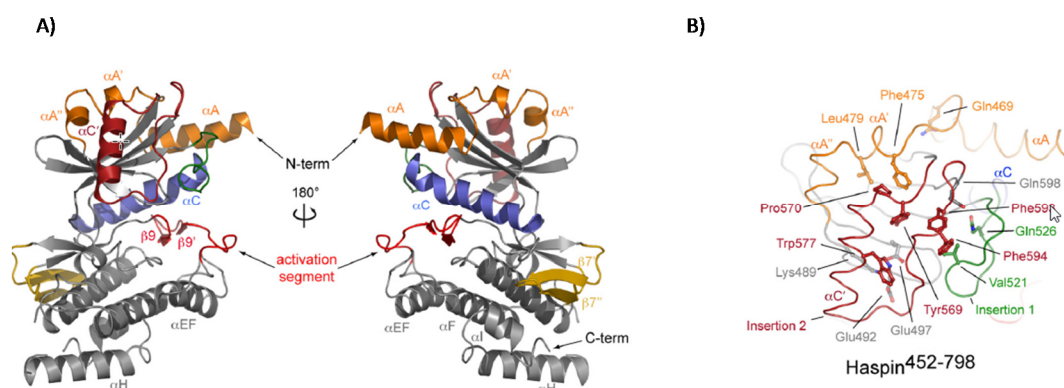


Figura 19. Estructura de HASPIN.

A) Dos modelos con rotación 180°. Destacando el dominio N-terminal en naranja, $\beta 3$ - αC loop en verde y el segmento de activación en rojo. B) Región del lóbulo N-terminal, destacando los residuos críticos para las interacciones. Villa y col. 2009 [181]

Las diferencias más destacadas del dominio quinasa de HASPIN son que por un lado mantiene una posición estable (no flexible) de la hélice C y el P-loop, que proporciona una conformación activa e indica que la actividad de la quinasa es constitutiva e independiente de la fosforilación de determinados residuos presentes en el bucle de activación.

En segundo lugar, el dominio N-terminal de HASPIN se fosforila ampliamente durante la mitosis, siendo probable que esta fosforilación module el acceso de HASPIN a sus sustratos.

En tercer lugar, en la mayoría de quinasas, el segmento de activación es un elemento regulador de 35 residuos localizados entre los 2 motivos conservados, el DFG y el APE (adenina, prolina, glutámico). El segmento de activación de HASPIN cambia el motivo DFG por DYT y el bucle de activación es más corto.

En cuarto lugar, el ATP se une al centro activo formando interacciones típicas con la región bisagra (*Hinge*). Se ha visto que uno de los grupos fosfato interacciona con el aspártico

del motivo DYT. Como HASPIN necesita iones Mg^{2+} para su actividad, es probable que el Mg^{+2} se coordine con uno de los fosfatos del DYT.

En quinto lugar, las ePK típicas interaccionan con un grupo fosfato del ATP mediante el residuo Lys168, y también con Arg (Arg-648) del motivo HRD (His-Arg-Asp), del segmento de activación implicado en la estabilización de la conformación activa. Este residuo es clave para la activación de la quinasa y transferencia del fosfato. En el caso de HASPIN, esta interacción se produce mediante enlaces directos de hidrógeno formados por el Asp-649 y la His-651, este último residuo se encuentra altamente conservado y es característico de HASPIN y funciona de forma equivalente al residuo Lys-168 en la mayoría de ePK (residuo catalítico) (Fig. 19).

Por último, HASPIN presenta un núcleo de residuos aromáticos grande y muy conservado que estabiliza la conformación de todo el segmento[157][179].

1.3.3.2. Inhibidores de HASPIN.

Aunque no se ha explorado ampliamente el espacio químico de los compuestos de bajo peso molecular dirigidos a HASPIN, hasta la fecha varias estructuras (por ejemplo, derivados de acridina, β -carbolina o 5-yodotubercidina (5-ITu)) han surgido como inhibidores de HASPIN.

Una de las primeras moléculas utilizadas en las investigaciones sobre HASPIN fue la 5-ITu, un derivado del ribofuranosil (5-yodo-7-b-D-ribofuranosil-7H-pirrol[2,3-d] pirimidina-4-amina) descrita inicialmente como un potente inhibidor de la adenosina quinasa [182]. Esta molécula de tipo nucleótido inhibe fuertemente a HASPIN con una IC_{50} entre 5 y 9 nM. Inicialmente, 5-ITu se usó principalmente para obtener una mejor comprensión de la estructura de HASPIN y sus funciones en el ciclo celular, especialmente durante la mitosis y meiosis [160]. Los resultados obtenidos con la 5-ITu como herramienta para la identificación de las

funciones biológicas de HASPIN como quinasa mitótica son de gran interés, sin embargo dado el diseño de su estructura donde incorpora a la iodina, podría presentar importantes problemas en el metabolismo de las hormonas tiroideas. Además, posteriormente se ha demostrado que también inhibe a DYRK2A y CLKs [183].

Posteriormente, Cuny y colaboradores en una campaña de HTS identificaron dos compuestos derivados de la β -carbolina, Harmine y Harmol, con importante actividad inhibitoria frente a HASPIN con IC_{50} de 590 y 770 nM respectivamente. Estos compuestos también inhibieron las quinasas de la familia de DYRK, con IC_{50} de 30 y 350nM frente a DYRK1 y 50 veces menos potentes frente a DYRK2 [184][185][186]. Por la tanto, estos compuestos son inhibidores más potentes de DYRK1 que de HASPIN. Harmine se ha usado en estudios de proliferación celular y para estudiar las funciones de estas dos quinasas. Se sabe que los inhibidores derivados del β -carbolina actúan como psicoactivos con importantes efectos adversos asociados con el sistema nervioso central lo cual limita su posible desarrollo como antitumorales en humanos [152].

Por otra parte, los análogos LDN-192960 y LDN-209929, compuestos derivados de acridina identificados también mediante HTS, mostraron una notable inhibición frente a HASPIN con valores IC_{50} de 10 y 5.5 nM respectivamente y fueron 180 veces más selectivos con respecto a DYRK2. [187]

Posteriormente, fue diseñado el compuesto LDN-211898 derivado del farmacóforo de la β -carbolina, pero con cadenas laterales similares a las que presentan los análogos de acridinas. Este compuesto mostró una IC_{50} para HASPIN de 100nM y era 150 veces más selectivo frente a DYRK2. Aunque a 10 μ M inhibió a otras 13 quinasas [188]. Novartis realizó una búsqueda mediante cribado de librerías de compuestos frente a la quinasa MELK y descubrió que el compuesto Melk8a mostró la mejor potencia de inhibición contra HASPIN (IC_{50} de 190nM).

Sin embargo, este compuesto no resultó ser selectivo mostrando actividades submicromolares frente a un grupo de quinasas incluyendo GSK3, CDK2, AKT1, FLT3 [166].

Kestav y colaboradores han desarrollado una nueva generación de inhibidores tipo bisustrato: análogos de adenosina conjugados con oligoarginina en inglés *Adenosine analogue-oligoarginine conjugate* o ARC. Estas son moléculas conjugadas que contienen por un lado un fragmento aromático (nucleótido) dirigido al sitio del ATP de la enzima con alta afinidad que está fusionado a un péptido que mimetiza el extremo N-Terminal de la H3, el cual se une al sitio del sustrato con alta afinidad. Este tipo de compuesto se caracteriza por mostrar una elevada afinidad, con valores de K_d de 0,42nM frente a HASPIN con un buen índice de selectividad [189]. La principal ventaja de los inhibidores ARC es su capacidad potencial para generar un mayor número de sitios de interacción con la enzima que podría dar como resultado alta afinidad y selectividad de los compuestos conjugados. Este enfoque dio lugar al compuesto ARC-3354 con una K_d subnanomolar que no se tradujo en una buena inhibición de la fosforilación de H3-Thr3. Efecto que los autores explican indicando una posible baja permeabilidad celular de estos compuestos y por lo tanto limitando su uso terapéutico [189].

Todos los inhibidores descritos hasta ahora han mostrado inhibición bioquímica y celular de HASPIN, pero son poco selectivos y no se han utilizado para demostrar el potencial terapéutico de HASPIN.

CHR6494 es el único inhibidor de HASPIN con el que se ha demostrado que la inhibición de HASPIN puede tener relevancia terapéutica con resultados tanto *in vitro* como *in vivo* [190]. CHR-6494 es una imidazopiridazina identificada por HTS. Es un inhibidor muy potente de HASPIN con un valor de IC_{50} de 2 nM que inhibe el crecimiento de líneas celulares de cáncer de cérvix, colon y mama con valores de GI_{50} promedios de 500nM, además de modular los niveles de H3-Thr3 e inducir apoptosis. Tras el tratamiento con este inhibidor se observaron anomalías en el huso mitótico, defectos en la alineación cromosómica y en los

centrosomas. Además, en xenografts con células de cáncer de colon se produjo una reducción del crecimiento tumoral. Los autores reportaron la selectividad de CHR-6494 en un panel de solo 27 quinasas a 100nM, concentración mucho más baja que la utilizada en muchos de los ensayos. Este compuesto forma parte de la colección del CNIO y fue testado en un panel interno de quinasas y mostró una $IC_{50} < 100$ nM en CDK8, CDK19, CDK9, FLT3, PIM1 y PIM2. Por lo tanto, parece que CHR-6494 es un inhibidor multiquinasa y se debería tener en cuenta para la interpretación de los resultados antes reportados. Recientemente, Han y colaboradores han utilizado CHR-6494 para evaluar el potencial terapéutico de la inhibición de HASPIN en melanoma. CHR-6494 inhibió el crecimiento de líneas de melanoma, la migración e indujo apoptosis tanto como agente único como en combinación con un inhibidor de MEK, siendo la combinación más eficaz. Nuevamente, hay que ser prudentes en la interpretación de estos resultados dado su perfil multiquinasa [191].

Recientemente, Opoku-Temeng y colaboradores identificaron mediante la mejora de un compuesto identificado en una campaña de cribado basado en un ensayo bioquímico de HASPIN, los compuestos HSD972, HSD929 [192]. Estos son inhibidores de HASPIN con una IC_{50} de 14 y 61nM respectivamente. Ambos compuestos inhibieron la proliferación de células Hela y HCT116 a concentraciones bajo micromolar e indujeron arresto en G2M y apoptosis a concentraciones por encima de 10 μ M. Pero estos resultados se deben tomar con cautela ya que no se presenta ningún dato de selectividad de los compuestos.

1.4. Aproximación al descubrimiento temprano de fármacos.

El camino que conlleva al descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos para obtener un medicamento aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) y poder ser comercializado como una nueva entidad molecular (NME) es largo y costoso [193]. El proceso se inicia con la identificación de la diana, la validación molecular y celular de la diana que está implicada en el desarrollo de una enfermedad. Posteriormente, el descubrimiento del farmacóforo, su exploración, la optimización de sus propiedades, el estudio de su eficacia *in vivo*, los ensayos de seguridad biológica y los ensayos clínicos de no toxicidad y eficacia del nuevo tratamiento en pacientes [194]. Este es un proceso que además de largo y costoso es poco exitoso. El tiempo transcurrido hasta que un fármaco es aprobado por las agencias internacionales FDA o EMEA (European Medicines Evaluation Agency) es de entre 10-15 años y solo un porcentaje mínimo de las moléculas candidatas llegan a fases clínicas (Fig. 20). Solo el 5% de los medicamentos contra el cáncer que entran en los ensayos clínicos alcanzan la aprobación para su comercialización [195]. Las causas son varias, el 39% debido a problemas farmacocinéticos de las nuevas moléculas y el 30% por problemas de falta de eficacia (escuela de medicina UCM), lo cual ha supuesto en los últimos años una estabilización de nuevos fármacos comercializados [196].

Sin embargo, el desarrollo espectacular de nuevas tecnologías está contribuyendo a cambiar los tiempos de este proceso. Por un lado el impulso de las técnicas de genómica desarrolladas a partir de la secuenciación del genoma humano está jugando un papel muy importante en la identificación de nuevas dianas especialmente en oncología por los múltiples cambios y mutaciones que se producen en el desarrollo tumoral [197]. Por otro lado, el desarrollo de la biología estructural y la quimioinformática [198], que han permitido llevar a cabo cribados virtuales mediante técnicas computacionales, y el diseño racional de fármacos han proporcionado herramientas que permiten seleccionar moléculas con mayores posibilidades

de éxito [199]. Por otra parte, el desarrollo de la robótica y la automatización de los procesos de cribado están acelerando los procesos de búsqueda e identificación de forma sorprendente. La implementación de metodologías de cribado a gran escala como los sistemas *HTS* (*high throughput screening*) y *ultraHTS* han permitido analizar librerías de hasta millones de compuestos de bajo peso molecular y/o fragmentos. Todo ello apunta hacia un modelo más eficiente y posiblemente con mayor éxito [200] [201].



Figura 20. Cronograma del desarrollo de un nuevo fármaco hasta su aprobación por la FDA. Figura adaptada del artículo divulgativo *The Biopharmaceutical Research and Development Process*

1.4.1 Fases del proceso de descubrimiento de fármacos.

El descubrimiento de nuevos fármacos en la actualidad difiere significativamente del procedimiento tradicional, pues el diseño exitoso de nuevos fármacos requiere que las múltiples propiedades de las moléculas se optimicen simultáneamente [202]. Por ello, el descubrimiento de fármacos es un proceso multifactorial en el que intervienen diversas disciplinas científicas y técnicas de forma coordinada (química médica, bioquímica, biología celular, biología estructural y química computacional). Estas están organizadas secuencialmente en varias fases interrelacionadas con el objetivo final de dotar a la molécula de un amplio perfilado multi-paramétrico de sus propiedades fisicoquímicas, biológicas, farmacológicas y toxicológicas

[195]. Todo ello, permite el diseño de un “pre- fármaco” con eficacia terapéutica y con seguridad biológica en modelos animales.

La metodología empleada actualmente en el descubrimiento de fármacos incorpora de forma temprana, desde las fases iniciales del proceso hasta la fase de optimización final, la predicción y caracterización de las propiedades ADME-T (Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción, Toxicidad,) y farmacocinéticas de la molécula candidata en paralelo con sus propiedades bioquímicas y farmacológicas moleculares. Esta nueva metodología es conocida como el ciclo del descubrimiento del fármacos (Fig. 21)[203].

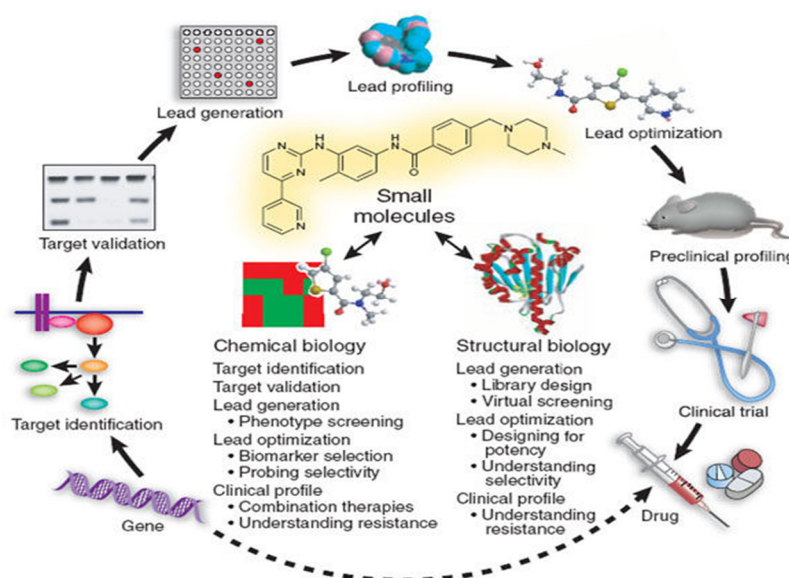


Figura 21. El proceso de Descubrimiento y desarrollo de fármacos: desde el gen hasta el fármaco.

Los cuatro pasos clave del descubrimiento de fármacos: la generación de la molécula candidata, su perfilado, optimización y caracterización preclínica. Collins y col. 2006 [195]

El proceso de identificación y desarrollo de un fármaco se estructura en la práctica de forma secuencial en varias fases y son básicamente las que se describen a continuación.

1.4.2. Identificación y validación de la diana.

Una diana farmacológica es una entidad biológica (gen, ARN, proteína) potencialmente relacionada con una patología y susceptible de ser manipulada farmacológicamente. La labor

de la investigación terapéutica es encontrar una molécula o entidad química (fármaco) capaz de modificar y revertir la patología incidiendo directamente sobre la molécula clave o diana terapéutica. La diana molecular debe de tener características de “drogabilidad ” es decir, que potencialmente puede interactuar con un compuesto y provocar una respuesta biológica que pueda medirse tanto *in vitro* como *in vivo*. La validación de la diana usualmente implica estudios experimentales *in vitro* e *in vivo*, en modelos celulares o modelos animales manipulados genéticamente. Disponer de una diana terapéutica validada es esencial para el éxito en el descubrimiento y desarrollo del fármaco.

1.4.3. Identificación de las moléculas de partida o “hits”

1.4.3.1. Selección de la metodología de búsqueda

Hay varias estrategias y diferentes metodologías que se emplean para la identificación de compuestos potencialmente activos frente a una diana seleccionada (Fig. 22) [204]. Básicamente, las estrategias son dos: lo que se conoce como diseño racional de fármacos y el cribado. El diseño racional, basado siempre en el conocimiento de la estructura de la diana, se puede realizar “de novo” o a partir de farmacóforos conocidos. El proceso se completaría con la síntesis de las nuevas moléculas diseñadas. El cribado, se puede realizar experimentalmente con diferentes puntos de partida como pueden ser librerías de compuestos químicos, productos naturales, fragmentos de compuestos químicos o péptidos, o de forma virtual (“*in silico*”). También la identificación de las moléculas de partida se puede realizar con una combinación de las dos estrategias y varios de los puntos de partida mencionados.

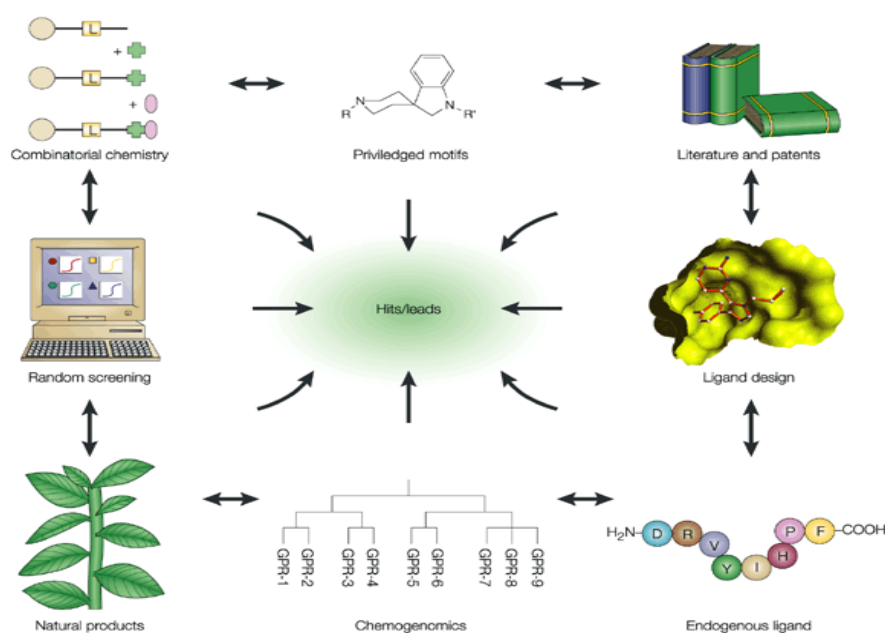


Figura 22. Estrategias metodológicas para la identificación de compuestos activos. Bleicher y col. 2003 [204]

Según la estrategia utilizada para la identificación de moléculas activas, los requisitos iniciales y el resultado serían los siguientes:

- Para realizar un cribado virtual se debe disponer de la estructura cristalográfica de la diana o si no generar un modelo de homología para que mediante técnicas computacionales y programas de acoplamiento molecular podamos cribar librerías virtuales de compuestos. Con esta metodología predeciremos afinidades e interacciones biomoleculares que posteriormente tendremos que confirmar experimentalmente.

- La síntesis de novo de posibles moléculas activas la podemos realizar mediante diseño computacional o bien por reemplazamiento de farmacóforos identificados en campañas de cribado o descritos en artículos o patentes.

- El cribado experimental de librerías se puede realizar con librerías de compuestos que obedezcan a la regla del 5 de Lipinski (regla que recoge un conjunto de pautas para clasificar las propiedades de las moléculas, claves en el proceso de optimización de las propiedades de un fármaco) [205] (Fig. 23), en ensayos bioquímicos y/o celulares (fenotípicos), desde el punto

de vista experimental y aplicando procedimientos de HTS. Las librerías pueden ser grandes colecciones de compuestos, o bien enfocadas basadas en el conocimiento de ligandos de la diana o librerías de productos naturales que permitirá identificar metabolitos secundarios a partir de extractos naturales de organismos marinos, plantas o microorganismos. También pueden ser librerías de fragmentos ($PM \leq 500$ Da) que son ensayados a altas concentraciones normalmente en co-cristalización con la diana para identificar ligandos mM que se pueden utilizar como bloque inicial para diseñar moléculas de mayor tamaño y afinidad [206].

Los avances en robótica y sistemas computacionales para el tratamiento de datos (“*data mining*, *big data*”) han permitido una gestión eficiente y rápida de la información, lo cual ha posibilitado ensayar cientos de miles de compuestos contra la diana y su identificación estructural posterior [193].

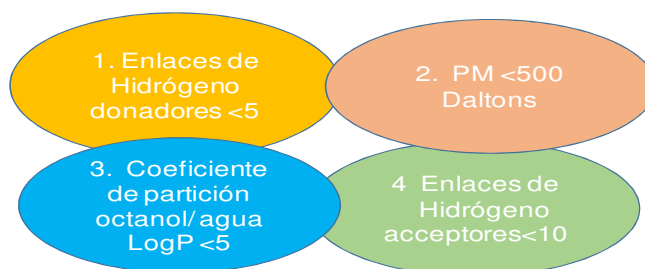


Figura 23. La regla del 5 de Lipinski.

Está relacionada con las propiedades fisicoquímicas de un compuesto y predice la probabilidad de que un compuesto químico presente mala adsorción tras administración oral en caso de violarse más de uno de los 4 criterios.

1.4.3.2. Identificación de moléculas activas mediante cribado experimental.

El procedimiento utilizado para la identificación de los compuestos de este trabajo ha sido el cribado por HTS. En primer lugar, es necesario diseñar un procedimiento experimental que generalmente es un ensayo que cuantifica la actividad biológica del ligando o compuesto y permite discriminar moléculas activas o “*Hits*” de moléculas no activas o “no *Hits*” (Fig. 24).

Mediante el ensayo se realiza el cribado experimental (*HTS*) de una colección de compuestos o librerías de compuestos seleccionadas. Los “*hits*” identificados son validados mediante ensayos de confirmación en formato generalmente de dosis respuesta (DR) para cuantificar la potencia en términos de IC_{50} . Los compuestos con potencia suficiente, son seleccionados para estudiar la selectividad en ensayos secundarios y validar su actividad en ensayos celulares para determinar la actividad moduladora de biomarcadores específicos.

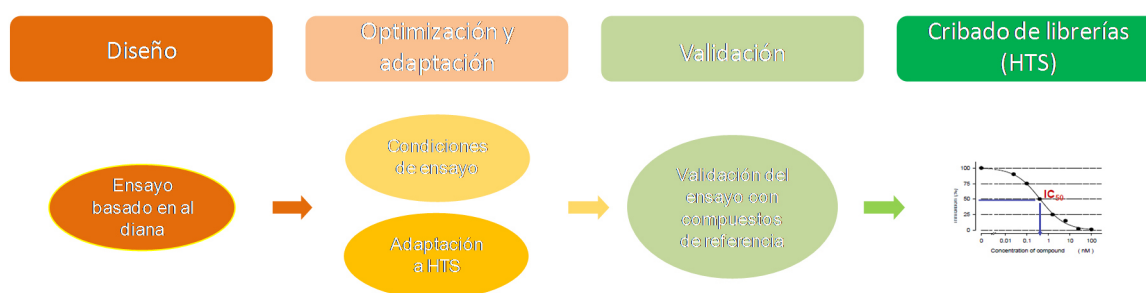


Figura 24. Metodología de trabajo para el desarrollo y validación de un ensayo bioquímico para la fase de cribado o *HTS*.

1.4.4. Validación y generación de moléculas activas o “hit generation”.

Las moléculas activas identificadas a partir de los cribados normalmente tienen la propiedad intelectual comprometida ya que provienen de librerías comerciales. Esta etapa tiene como objetivo diseñar nuevas moléculas con espacio químico patentable. Para ello en primer lugar se validarán las moléculas activas identificadas, mediante la síntesis de unos pocos análogos que confirmen que tenemos un grupo de moléculas activas y no un compuesto único, es decir, que modificando la decoración del farmacóforo como capaces de modificar la potencia, selectividad y propiedades ADME-T. La información generada con estos pequeños estudios de relación estructura actividad (SAR), así como la información estructural disponible de la diana o información de otros ligandos se utilizarán para hacer diseño racional de nuevos inhibidores. Las nuevas moléculas propuestas se priorizarán mediante estudios de acoplamiento molecular

para su síntesis y caracterización. Estos resultados ayudarán a seleccionar y priorizar las mejores series químicas para las siguientes fases [206],[207].

1.4.5. Fase de molécula activa a cabeza de serie o “Hit to lead” (HtL).

Una vez seleccionada una o varias series químicas, el objetivo de esta etapa es refinar y mejorar cada serie diseñando compuestos más potentes y selectivos con propiedades farmacocinéticas (PK) adecuadas que permitan seleccionar el compuesto líder o cabeza de serie. La fase de HtL es un proceso multifactorial que implica por un lado la exploración químico médica de la molécula y en según lugar una caracterización extensiva de los compuestos que incluyen propiedades ADME-T tanto *in vitro* como *in vivo* con el objetivo de generar información útil para la optimización de la molécula de partida.

Se sintetizarán análogos de la molécula activa explorando todas las posiciones de la molécula y con diferentes patrones de sustitución para generar relaciones estructura actividad (SAR) y relaciones estructura propiedades (SPR). Parámetros *in silico* como el LogP o la regla del 5 para moléculas tipo fármaco también se tendrán en cuenta.

En esta etapa se suele buscar mayor selectividad y la eliminación de efectos no asociados a la diana o *off-targets*, conservando las propiedades favorables iniciales del farmacóforo de partida.

La selección de compuestos candidatos para progresar a fases posteriores esta basada en los perfiles multifactoriales que presentan los compuestos en relación a la potencia bioquímica, actividad celular, estudios tempranos de ADME-T y buena farmacocinética [206].

1.4.5.1 Propiedades ADME-T.

La farmacocinética estudia el curso temporal de un fármaco dentro del organismo y engloba los procesos denominados ADME-Tox (ADME-T), acrónimo de Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad. El conjunto de estos procesos fisiológicos

determinan la relación de los fármacos con el organismo, desde el momento de su administración hasta que llegan al lugar donde ejercerán su acción terapéutica y posteriormente su excreción y eliminación [208].

Un medicamento se disuelve en el tracto gastrointestinal, se absorbe a través de la pared intestinal y luego pasa el hígado para entrar en la circulación sanguínea. El porcentaje de la dosis que llega a la circulación se llama biodisponibilidad (Fig. 25). Desde allí, el medicamento se distribuirá a varios tejidos y órganos en el cuerpo. El grado de distribución dependerá de la estructura y propiedades fisicoquímicas del compuesto. Por último, el fármaco se unirá a su diana molecular, por ejemplo, un receptor, una quinasa o un canal iónico y ejercerá su acción terapéutica. Cada uno de estos procesos es predecible y medible. Los parámetros farmacocinéticos y las propiedades biofarmacéuticas de un fármaco como son la concentración plasmática del fármaco, su distribución por el organismo y su eliminación se pueden medir mediante parámetros cuantificables como son el área bajo la curva (AUC), el tiempo de vida medio ($t_{1/2}$), el volumen de distribución (Vd) y el Aclaramiento (Cl). El conjunto de estos parámetros junto con estudios de citotoxicidad como por ejemplo cardiotoxicidad determinan el perfil ADME-T de un fármaco determinado [209]. La vida media del compuesto nos permite establecer la frecuencia de la dosis necesaria y su biodisponibilidad la dosis a utilizar.

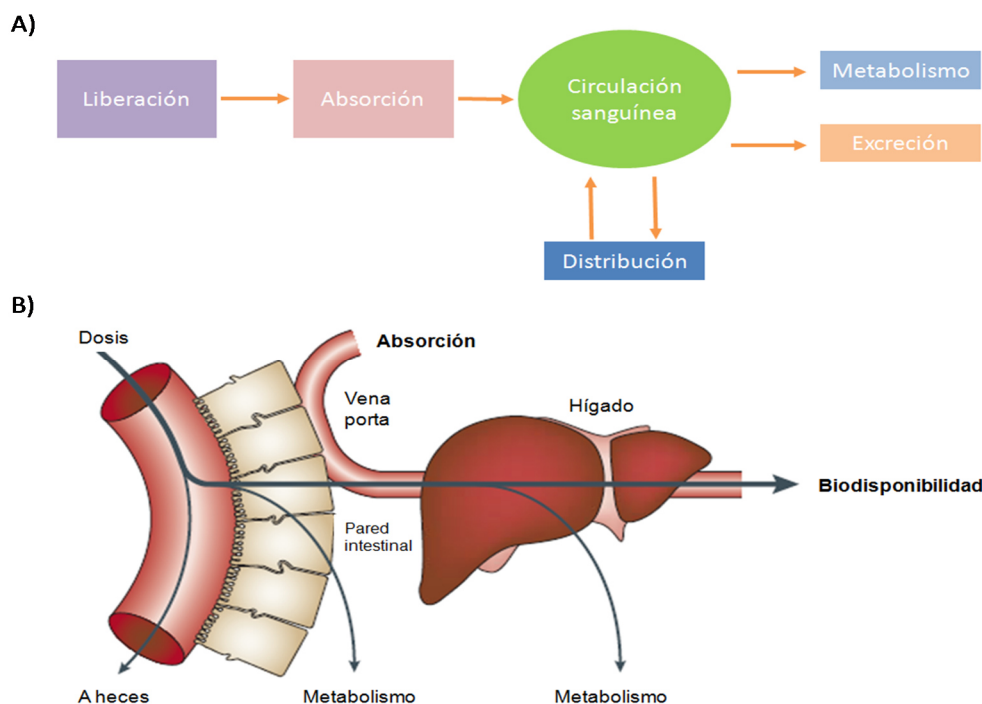


Figura 25. Propiedades ADME-T.

A) Diagrama secuencial de las fases del proceso ADME-T. B) Metabolismo o biotransformación de fármacos que tiene lugar en la pared del intestino, durante la absorción, pero principalmente en el hígado. Van de Waterbeemd y col. 2003 [209]

Las propiedades farmacocinéticas indeseables, como la mala absorción, vida media demasiado larga o demasiado corta, un elevado metabolismo y problemas de seguridad biológica son aspectos que contribuyen al fracaso de muchos candidatos en las primeras etapas de los programas de diseño y desarrollo de fármacos [210][208]. Gracias a la temprana caracterización de las propiedades ADME-T ha hecho que disminuya considerablemente el número de candidatos a fármaco que fracasen debido a una pobre farmacocinética, siendo ahora las principales causas la falta de eficacia o la toxicidad. En las últimas dos décadas, múltiples estudios han propuesto que el control de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos, tales como la lipofilia y polaridad puede suponer un beneficio para tener una mayor probabilidad de éxito de los nuevos fármacos ya que al final estos parámetros redundan en las propiedades ADME-T de las moléculas. En los últimos años, se está prestando más atención la influencia de las propiedades fisicoquímicas en la promiscuidad y toxicidad *in vivo* [211].

1.4.5.1.1. Solubilidad, absorción y permeabilidad

Las propiedades biofarmacéuticas de un fármaco (permeabilidad, disolución, solubilidad y absorción), condicionan parámetros muy importantes como la biodisponibilidad, que es el porcentaje de dosis que llega a la circulación sistémica [209]. La vía de administración más común de un fármaco es la oral. Esta forma tiene muchas ventajas respecto a otras vías (automedicación) y algunas desventajas que pueden implicar problemas de absorción y dar lugar a problemas de variabilidad en la biodisponibilidad, por las diferencias individuales en el metabolismo pre-sistémico de las drogas al paso por el intestino y el hígado [212]. Hay dos procesos fundamentales que condicionan la absorción oral de los fármacos, la disolución (proceso por el cual un fármaco sólido se disuelve en el fluido gastrointestinal) y la permeabilidad a través de la pared intestinal y en el torrente sanguíneo. Estos procesos son complejos y se rigen por eventos biológicos y propiedades fisicoquímicas tales como hidrosolubilidad, lipofilia, etc [213]. Otras propiedades fisiológicas como el entorno de pH y las enzimas metabólicas en del tracto gastrointestinal también juegan un papel importante en la absorción oral. La compleja interacción entre estos factores biológicos y fisicoquímicos hace que la predicción de la absorción oral de drogas sea difícil [212]. Existen modelos matemáticos que predicen la absorción basándose en propiedades, como solubilidad y permeabilidad, potencial absorción o dosis máxima absorbida, son modelos estáticos. Otros modelos matemáticos además incluyen el tiempo de tránsito intestinal y flujos sanguíneos [212]. Por otra parte, están los modelos experimentales clásicos farmacocinético compartimentales que describen la absorción como un proceso cinético de primer orden.

La permeabilidad es la capacidad que tiene un fármaco para atravesar las diferentes membranas celulares y poder acceder a los lugares de acción terapéutica por el torrente sanguíneo. Esta capacidad está condicionada por sus propiedades fisicoquímicas, como el tamaño de la molécula, la interacción mediante enlaces de hidrógeno, el nivel de ionización

(*pKa.*) y su liofilia o superficie polar [214]. La lipofilia que expresa la hidrofobicidad, es decir, la afinidad que tiene el fármaco por las membranas biológicas. El nivel de permeabilidad de un fármaco y el grado de liofilia se correlacionan directamente y estos a su vez con la biodisponibilidad y, por tanto, con la eficacia y la ventana terapéutica [215]. Hay varios métodos *in vitro* para medir y predecir la permeabilidad de los candidatos a fármacos. Uno muy utilizado es el modelo celular Caco-2 que sirve como modelo para la absorción intestinal humana[216]. Además, hay metodologías que miden directamente la permeabilidad como son la medida de unión del fármaco a lisosomas mediante biosensores de SPR (“*surface-plasmon-resonance*”). Así como el método de permeabilidad de membrana artificial denominado PAMPA (Permeación con Membranas Artificiales en Paralelo), un ensayo no celular para el estudio de la absorción pasiva y permeabilidad de fármacos, donde se mide la capacidad de la molécula para atravesar la membrana celular de la mucosa o membrana plasmática [217].[213]. [209].

La predicción temprana de las propiedades biofarmacéuticas como son la permeabilidad, disolución, estabilidad y solubilidad (la solubilidad también depende de la forma de administración) y absorción, en paralelo a la actividad farmacológica permitirá la priorización de candidatos optimizando el rendimiento de los procesos e incrementando la probabilidad de seleccionar los mejores perfiles de biodisponibilidad oral y eficacia [216] [218].

1.4.5.1.2. Metabolismo de los fármacos.

El organismo tiene la capacidad de metabolizar xenobióticos, entre ellos los fármacos al objeto de facilitar su eliminación. El hígado contribuye de forma mayoritaria a la funcionalización de los xenobióticos para facilitar la eliminación, mediante un conjunto de reacciones, globalmente denominadas reacciones de biotransformación, en las que se modifica de manera más o menos compleja la estructura química de los xenobióticos para aumentar su hidrosolubilidad y facilitar su eliminación [219]. Existen otros tejidos extrahepáticos, aunque

en menor medida, que también tienen esta función como son: intestino, pulmones, piel y riñón. Hay varios tipos de reacciones de biotransformación catalizadas por las enzimas hepáticas, (oxigenasas, reductasas, transferasas): oxidación-reducción, hidrólisis, glucuronidación, metilación y conjugación entre otras [219]. Estas reacciones son clasificadas de fase I y fase II (Fig. 26). Las reacciones de fase I engloban los procesos de hidrólisis, oxidación y reducción, entre otras. En la fase II del metabolismo la molécula de fármaco funcionalizado se transforma aún más mediante reacciones de conjugación. Estos incluyen, entre otras, glucuronidación y sulfatación, así como conjugación con glutatión (Fig. 26) [209].

Las reacciones de fase I son catalizadas por las enzimas hepáticas monooxigenasas de función mixta. Existen dos grandes familias de oxigenasas en el hígado, las dependientes de citocromo P450 (denominadas P450 o CYP) y las flavín monooxigenasas (denominadas FMO).

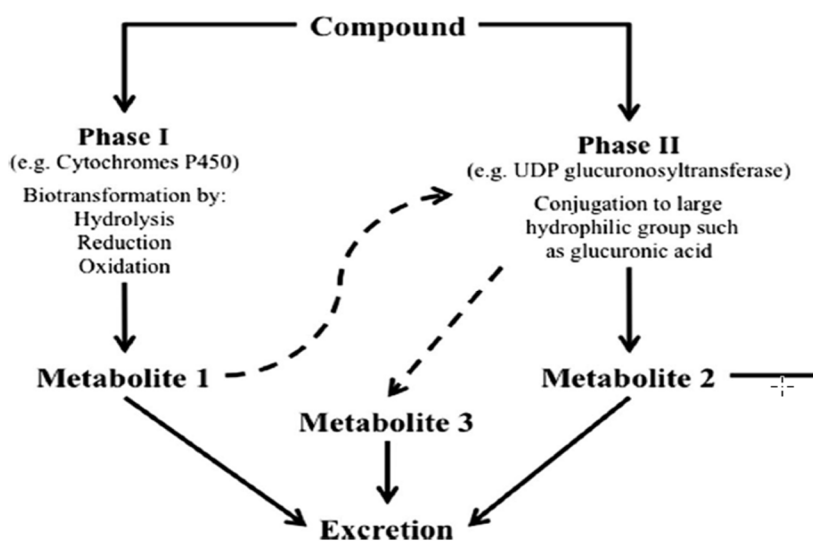


Figura 26. Fases del metabolismo de fármacos (Biotransformación). Rougée y col.2014 [220]

En el metabolismo de las drogas de fase I, las enzimas con mayor implicación son los citocromos P450s, en particular las isoformas, CYP1A2, CYP2A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4. Aproximadamente el 60% de los fármacos son metabolizados para su eliminación a través de estos sistemas enzimáticos. La mayoría de los procesos

metabólicos de los fármacos utilizan solamente algunas de las isoformas del citocromo P450. La CYP3A4 es una de las isoformas más importantes, metaboliza en torno al 55% de los xenobióticos, seguida por CYP2D6(25-30%), CYP2C9 y CYP2C19 (15-20%) [221].

Conocer la estabilidad metabólica de los fármacos es fundamental para determinar la concentración de fármaco en sangre y predecir la biodisponibilidad y la toxicidad. Un compuesto metabólicamente inestable, aunque fuera absorbido oralmente, nunca podría alcanzar la concentración terapéutica requerida [216]. Existen varios modelos *in vitro*, para estudiar la estabilidad de los compuestos que son usados habitualmente en los programas de descubrimiento de fármacos de forma rutinaria y eficaz como son las enzimas recombinantes CYP450s, microsomas hepáticos, fracciones S9 (sobrenadante de homogenado hepático a 9000g) y hepatocitos aislados. [222]. El ensayo *in vitro* de microsomas de hepatocitos es una técnica ampliamente usada en los programas de desarrollo de fármacos. Son fracciones de membrana del retículo endoplasmático del hepatocito donde se encuentran la mayor parte de las enzimas metabólicas que participan en los procesos de biotransformación [223].

Numerosos estudios indican que los microsomas son un método validado para detectar y predecir la inestabilidad metabólica de fármacos potenciales de forma temprana y descartar así los compuestos inestables que pudieran comprometer *in vivo* en etapas avanzadas la biodisponibilidad, el aclaramiento y eficacia terapéutica [222][224][225].

Las enzimas del citocromo P450 pueden ser inducidas o inhibidas por muchos fármacos y otras sustancias, debido a que sus sustratos no son específicos y esto puede conllevar interacciones entre fármacos (DDI, del inglés “*drug-drug interaction*”), que pueden ser por incremento de toxicidad o reducción de su efecto [219] [226].

Por tanto, complementariamente a los estudios de estabilidad de los compuestos es necesario estudiar las potenciales interacciones entre fármacos para predecir y descartar posibles problemas preclínicos y clínicos atribuidos a problemas metabólicos relacionados con

los CYP450s[227]. Las isoformas principales (3A4, 2C9, 2C19, 2D6, 1A2) son las responsables de los problemas de DDI, debido a que no presentan especificidad de sustrato, y son las responsables de metabolizar más del 90% de los fármacos comercializados [219].

Por tanto, en fases tempranas el estudio del metabolismo de drogas es importante para la optimización de los candidatos y obtener información predictiva sobre la naturaleza y las consecuencias del metabolismo de fármacos *in vivo*, evitando la selección de candidatos con propiedades desfavorables en relación al metabolismo de los fármacos.

1.4.5.1.3. Cardiocitotoxicidad: hERG como biomarcador.

La proteína hERG (“the **h**uman *E*ther-à-go-go-**R**elated **G**ene”), se expresa en múltiples tejidos y tipos de células, neural, musculo liso y células tumorales, pero se encuentra altamente expresado en células del músculo cardiaco (miocitos) y es donde su función y disfunción está mejor estudiada [228]. hERG es un miembro de la superfamilia de canales de potasio (VGK) [229].

La función fisiológica más caracterizada de hERG es la regulación del potencial de membrana y el control del ritmo cardiaco [228]. Está implicado en otros procesos tan esenciales y fisiopatológicamente relevantes como la transmisión de los impulsos nerviosos y la secreción de hormonas y neurotransmisores [230]. hERG, está considerado como un marcador de citotoxicidad cardiaca por la naturaleza promiscua de este canal para unirse e interaccionar con moléculas químicas y fármacos de naturaleza diversa, produciendo el bloqueo del mismo e induciendo disfuncionalidad y patologías cardiovasculares importantes, como las arritmias que pueden degenerar en fibrilación ventricular y muerte repentina [231]. Estos efectos secundarios cardiocitotóxicos son una de las razones más comunes del fracaso de fármacos en los ensayos de seguridad que se realizan en fase pre-clínica [228][232].

Para estudiar el efecto de los compuestos en desarrollo sobre la modulación de hERGs se utilizan ensayos que se basan en los protocolos reglamentados de seguridad biológica dictados por la FDA [232]. Son ensayos de unión, utilizando radioligandos o fluorescencia polarizada, y ensayos electrofisiológicos, como “*patch-clump*”.

1.4.6. Fase optimización del cabeza de serie o “lead optimization” (LO)

El objetivo de esta fase final del proceso de descubrimiento de fármacos es mantener las propiedades favorables del compuesto y mejorar las deficiencias de la estructura detectadas en la fase de HtL que normalmente se relacionan con minimizar efectos tóxicos (principalmente cardiotoxicidad) y mejorar la farmacocinética. Todas las propiedades deben estar en equilibrio y armonizadas (físicoquímico, farmacológico, toxicidad y eficacia) requisitos indiscutibles para que esta molécula optimizada adquiera un perfil pre-fármaco, se valide su eficacia en modelos animales *in vivo* y progrese a la fase de pre-clínica.

Al igual que la fase HtL la fase de LO es un proceso multifactorial que implica por un lado la exploración químico médica más fina de la molécula y en según lugar una caracterización extensiva de los compuestos donde gana importancia el perfilado farmacocinético de las moléculas para poder acabar seleccionando un candidato con el que hacer la prueba de concepto *in vivo*, en el caso de moléculas antitumorales demostrar que son capaces de producir regresión tumoral *in vivo* a través de la modulación de su diana.

Como ya se comentó en el fracaso de los candidatos a fármacos una de las causas principales es la pobre biodisponibilidad y/o toxicidad [206]. Por ello, el proceso de descubrimiento de fármacos no termina sino que normalmente se intenta buscar otra molécula de reserva por si en el candidato seleccionado no progresa en su posterior caracterización preclínica o clínica. A su vez, estratégicamente se intenta tener una serie de reserva.

1.4.6.1. Estimación del tiempo de residencia para la priorización de moléculas candidatas.

El descubrimiento de fármacos se basa fundamentalmente en la identificación y optimización de moléculas a través de una serie de experimentos bioquímicos o celulares *in vitro*. Las métricas cuantitativas que resultan del análisis de los datos, valores IC_{50} , constantes de disociación (K_d) en equilibrio (afinidad de un fármaco por su diana) y la constante de inhibición (K_i), son habitualmente utilizadas para seleccionar y priorizar compuestos activos y evaluar los posibles efectos inhibitorios en otras dianas. Basándose en estos parámetros se establecen estudios de SAR/SPR para incrementar la afinidad y mejora las propiedades y predecir la actividad y eficacia de las moléculas *in vivo*. Sin embargo, estos parámetros termodinámicos de afinidad a menudo no muestran posteriormente correlación con los efectos en el contexto *in vivo*, pues las constantes en equilibrio tradicionalmente usados no informan suficientemente de los cambios temporales que se producen en sistemas abiertos como es el organismo [233]. En la determinación de estos parámetros no se tiene en cuenta ni la dinámica molecular y ni los cambios conformacionales de la diana, ni tampoco las interacciones estructurales del complejo enzima-ligando, ni las fluctuaciones que se producen en la concentración del fármaco en un entorno dinámico y cambiante como es el organismo. Las métricas de estos parámetros se obtienen en ensayos *in vitro* realizados en condiciones de sistema cerrado, donde el fármaco y la diana están presentes en concentraciones invariables a lo largo del transcurso del experimento. Sin embargo, en los organismos, en sistemas abiertos, la concentración de fármaco disponible para la interacción con una proteína está en constante cambio debido a diversos procesos fisiológicos. Dichos procesos incluyen absorción gastrointestinal, metabolismo hepático y renal y distribución tisular. Por tanto, las medidas de los parámetros *in vitro* en equilibrio no son suficientes en el contexto de las condiciones farmacocinética que se producen en los sistemas abiertos (Fig. 27).

En un sistema cerrado, un fármaco y su diana están presentes a concentraciones constantes, lo que permite establecer un equilibrio entre el fármaco unido y el fármaco libre y la diana. En un sistema abierto, la distribución *in vivo* del fármaco a través de la circulación sistémica, la distribución en el tejido, el metabolismo y la difusión dentro del tejido hacia las células que albergan la diana de interés están en constante cambio. En un sistema abierto, el verdadero equilibrio no se establece debido a la concentración cambiante de fármaco (Fig. 27A) [233]. En este sentido algunos autores sostienen que la eficacia de los fármacos *in vivo* no solo depende de la afinidad aparente del fármaco por su diana [234], sino que juega un papel importante la dinámica molecular y conformacional de la interacción fármaco-diana, concretamente los parámetros que miden la tasa de disociación del complejo binario, fármaco-diana (k_{off}), y el tiempo que se permanecen unidos, llamado tiempo de residencia (T_R) o como vida media disociativa ($t_{1/2}$) [235][236].

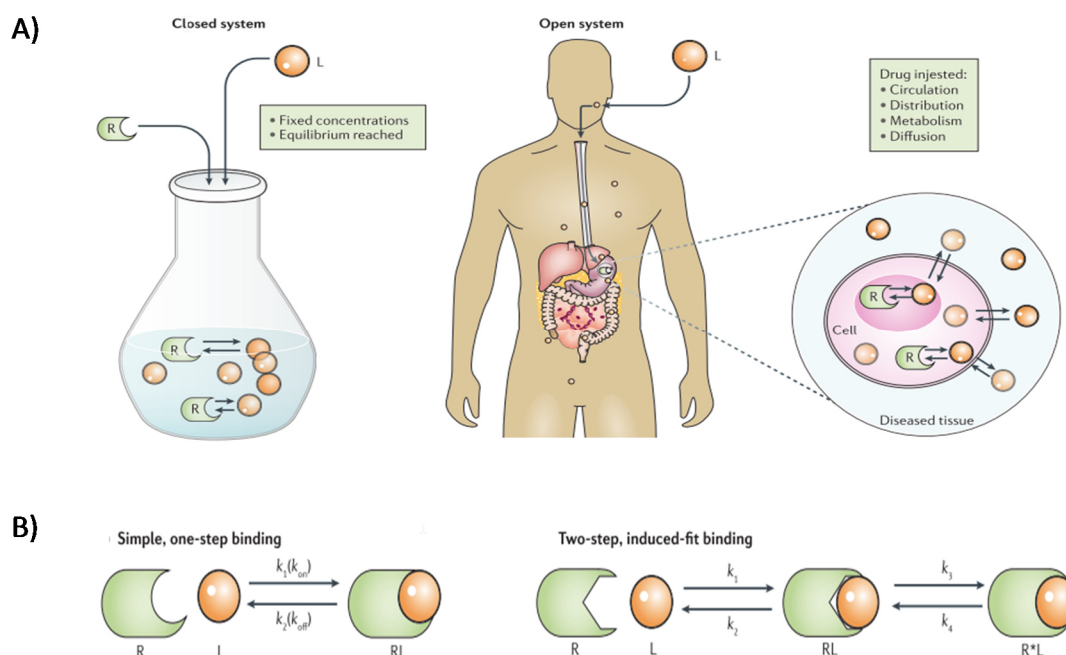


Figura 27. Esquema de los aspectos cinéticos de las interacciones fármaco-diana.

A) Modelo de sistemas cerrados *in vitro* y sistemas abiertos *in vivo* y la distribución por el organismo de un fármaco. B) Esquema de un modelo simple de unión y disociación del complejo fármaco-diana y de un modelo de dos pasos donde se produce un cambio conformacional de la diana incrementando la afinidad. K_1 , constante de asociación; K_2 , constante de disociación; K_3 , velocidad de isomerización directa; K_4 , velocidad de isomerización indirecta; L, ligando; R, receptor; RL, complejo inicial entre ligando y receptor; RL^* , complejo binario de alta afinidad entre ligando y receptor. Copeland y col. 2016 [233]

El T_R se considera el período durante el cual el receptor o diana está ocupado por su ligando o fármaco originando una respuesta farmacológica [233].

El tiempo de residencia también se puede definir en términos matemáticos como la relación inversa de la tasa de disociación del receptor-ligando k_{off} ($T_R = 1 / k_{off}$). Donde a su vez, la k_{off} está interrelacionada con la K_d , mediante la siguiente Ecuación ($K_d = k_{off} / k_{on}$), que deriva del modelo más simple que describe el mecanismo de un solo paso que supone que el ligando y receptor forman el complejo ligando-receptor sin ningún intermediario estable (Fig. 32B) [237].

Hay autores que sostienen que estos parámetros farmacodinámicos junto con los parámetros farmacocinéticos juegan un papel esencial en la predicción del comportamiento del fármaco en el organismo y su eficacia terapéutica, por lo que proponen un nuevo modelo que integre estos parámetros a la hora de la priorización y optimización de las moléculas cabeza de serie (Fig. 28) [238].

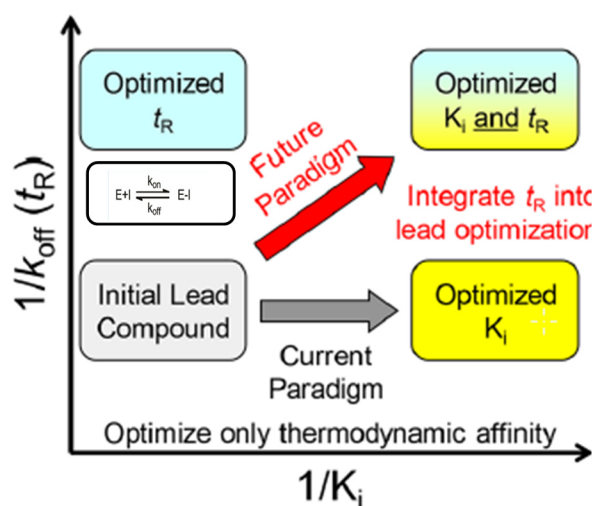


Figura 28. Nuevo modelo en la priorización de compuestos avanzados.

Se estudia la cinética de unión enzima-inhibidor, integrando el tiempo de residencia en la priorización de compuestos junto con los parámetros clásicos de IC_{50} , K_i y K_d . Tonge y col .2018 [238]

Numerosos autores consideran que el tiempo de residencia es mejor vaticinador de la eficacia *in vivo* que la afinidad termodinámica (K_d). De hecho, abundan los ejemplos de

fármacos que presentan tiempos de residencia prolongados que correlacionan con su eficacia, la durabilidad del efecto terapéutico, la seguridad y la minimización de los efectos *off-target* y de toxicidad [239][240]. No obstante, hay autores que indican que no siempre existe una correlación directa entre una alta afinidad del fármaco por la diana y un tiempo de residencia prolongado. Diferentes estudios de cinética de unión a fármacos, consideran que hay que tener en cuenta otras variables como el entorno químico, las variaciones estructurales dentro de una misma serie que comparten farmacóforo, y la relación estructura-cinética (*Structure kinetic relationship*, SKR) [241].

Además, los tiempos de residencia largos no dependen de una k_{on} larga o corta.. Esto es así, porque la constante de velocidad de asociación depende de la concentración del fármaco y de los factores farmacológicos asociados (absorción, distribución en tejidos). Mientras que la k_{off} no depende de los factores farmacológicos, depende enteramente de interacciones específicas (tales como, cambios conformacionales de la proteína, fuerzas no polares, e interacciones Van der Waals, unión a hidrógeno, en regiones del dominio catalítico [242]. Consecuentemente la duración de estas interacciones para algunos autores, es lo que relaciona la eficacia terapéutica del fármaco y la selectividad cinética por la diana.

Por lo tanto, en algunos casos, se obtendrán interacciones prolongadas del fármaco para maximizar la durabilidad del efecto farmacológico y en otros casos, un corto tiempo de residencia será suficiente para producir un efecto farmacológico deseado [239][233][243][240].

Por otra parte, los estudios de cinética de unión, además de ser útiles para la selección de los mejores perfiles de afinidad, potencia y tiempo de residencia, permiten estudiar la selectividad cinética de un compuesto frente a diferentes dianas. La afinidad relativa de un compuesto por otras dianas o proteínas en ensayos secundarios se usa comúnmente como una medida de la selectividad del compuesto para predecir los efectos secundarios no deseados. La selectividad, se basa en experimentos, como ya hemos dicho en condiciones de equilibrio,

mientras que los estudios de tiempo de residencia, aportan información de la selectividad cinética, de los compuestos en términos de tiempo que permanecen unidos el fármaco a su diana, y la durabilidad de los efectos farmacológicos. En este sentido hay autores que sostienen que un mismo compuesto unido a varias dianas puede presentar la misma afinidad en términos de constantes termodinámicas (K_d), pero con diferentes tiempos de residencia (Fig. 29) [238]. La selectividad cinética, en términos de tiempos de residencia, está relacionada directamente con la ventana terapéutica, con la concentración de fármaco en el tiempo (semivida $t_{1/2}$) y por tanto con el comportamiento farmacocinético (PK).[244][245].

En la última década, varios grupos han puesto en discusión la necesidad de integrar el tiempo de residencia en los programas de diseño racional de fármacos. Entre ellos, Copeland ha sido uno de los primeros en tratar de establecer una relación entre la cinética de unión y la eficacia terapéutica y ha planteado la necesidad de la integración de estos aspectos en el diseño racional de fármacos como un punto de partida en el nuevo modelo propuesto en la priorización de compuestos. Pero, sin dejar de lado la necesidad de profundizar en una mejor comprensión de los determinantes estructurales de los ligando, y cuales deben de ser los descriptores moleculares y las variaciones estructurales necesarias que introduzcan cambios en la cinética de unión de ligando (SKR) compatibles con el SAR [241]. Además, deben de ser considerados los estudios de dinámica molecular, donde se tengan en cuenta los cambios conformacionales de las dianas, más favorables a la unión de los ligandos y ser trasladados a la química médica para que pueda diseñar prospectivamente estos perfiles en una serie química.

Sin embargo, existe cierta controversia, pues otros grupos cuestionan la correlación entre tiempos prolongados de unión y la eficacia *in vivo*, aduciendo que estos aspectos pueden estar asociados a un tipo o una clase de fármaco y a la respuesta deseada [246]. Ni tampoco hay acuerdo general sobre cuales son los descriptores moleculares más apropiados para los estudios de relación estructura-cinética (SKR).

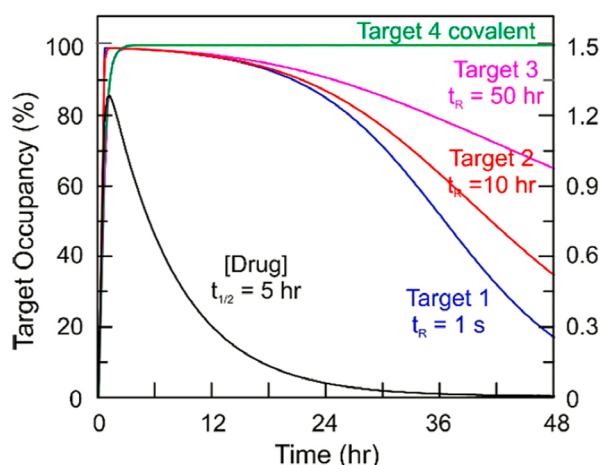


Figura 29. Ocupación de la diana dependiendo del tiempo.

Representación de la selectividad cinética de una droga frente a 4 dianas diferentes. Las uniones a las dianas 1, 2 y 3 son reversibles y la unión a la diana 4 es covalente. La constante de afinidad termodinámica es la misma, $K_d = 10$ nM, y los tiempos de residencia son diferentes. La ocupación de la diana se ha simulado con Kintek. P. Tonge y col .2018 [238]

No obstante sí hay consenso generalizado en que la eficacia de un fármaco depende del perfil farmacocinético y farmacodinámico y que el fundamento del concepto de tiempos largos de residencia han sido argumentados desde una óptica teórico [247]. La biodisponibilidad del fármaco en último término depende de las propiedades farmacocinéticas del mismo, comparar la constante de eliminación del compuesto con la k_{off} nos puede dar una idea de la duración de la unión del compuesto a la diana y la correlación con su perfil de PK, asumiendo que el valor de k_{off} obtenido *in vitro* va a ser similar a la situación en un modelo *in vivo*. Además el estudio de la cinética de unión de un fármaco podría explicar la falta de correlación observada, en ocasiones, entre el perfil farmacocinético de un fármaco y su efecto farmacodinámico.

No obstante este nuevo paradigma propuesto en la optimización de fármacos, que integra estudios de SKR, la dinámica molecular y conformacional (optimización cinética de unión del complejo receptor-ligando), ineludiblemente debe ir acompañado de las metodologías clásicas y complementariamente a los estudios de SAR, en la optimización de las afinidades y las propiedades de los compuestos mediante el diseño racional de fármacos. Por tanto estas nuevas sinergias pueden dar lugar al diseño de un fármaco con un perfil adecuado y ajustado a las necesidades planteadas [246].[248] [235].

1.4.7. Fase de estudios preclínicos en modelos de animales.

Finalmente, los pre-fármacos seleccionados se progresan a la fase de ensayos de prueba de concepto (PdC) *in vivo* y desarrollo preclínico [203]. La PdC *in vivo* consiste en demostrar en modelos animales de la enfermedad, en nuestro caso cáncer, tanto la modulación de biomarcadores mediante estudios de farmacocinética/farmacodinámica (PK/PD), como la eficacia en la inhibición del crecimiento tumoral. Tras la finalización de estas etapas hasta el desarrollo preclínico de los potenciales fármacos, las exigencias de los candidatos líderes son muy rigurosas y deben de pasar una serie de filtros hasta fases clínicas. Por ejemplo, las moléculas se deben caracterizar en modelos de genotoxicidad como el test de Ames y en modelos *in vivo* de comportamiento como el test de Irwin. Además, se deben realizar, PKs a altas dosis y con dosis repetidas para identificar el metabolismo inducido por la molécula y su perfil metabólico. Y por último, hay que establecer posibles problemas estabilidad química de la molécula así como la selección de la formulación del putativo fármaco.

2. Objetivos

2.1. Objetivos globales

Las evidencias del papel oncogénico de CDK8 en varios tipos de cáncer ha estimulado el interés por el desarrollo de inhibidores frente a esta diana. Hasta la fecha se han desarrollado inhibidores de CDK8 duales CDK8 / CDK19, dado la alta similitud de secuencia entre ambas proteínas.[95]

Sólo el inhibidor BCD-115 se encuentra en ensayos clínicos en fase I para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama avanzado metastásico (ER(+) y HER2 negativo)[26][124]. El resto de inhibidores publicados se encuentran en fase preclínica, han sido testados *in vivo* en ratón sin signos de toxicidad referidos. Sin embargo, los compuestos derivados del CCT251545 han mostrado signos de toxicidad tanto en ratón, rata como en perro [102], efecto que los autores lo atribuyen a la propia inhibición de CDK8.

El objetivo global de este proyecto de investigación ha sido identificar nuevos inhibidores de CDK8/CDK19 con mejor nivel de eficacia, selectividad y de seguridad biológica optimizada que permitan validar la eficacia terapéutica de la inhibición de dicha diana y a su vez ser una alternativa terapéutica frente a los existentes en clínica actualmente o como terapia adyuvante.

2.2. Objetivos específicos

1. Puesta a punto y automatización de un ensayo para poder identificar inhibidores de CDK8/CycC.

2. Realizar un cribado farmacológico de librerías de compuestos para la identificación moléculas activas como inhibidores de CDK8/CycC.
3. Caracterizar nuevas series químicas para ampliar el espacio químico y seleccionar una serie química para estudiar en las fases de HtL y LO para el desarrollo de inhibidores de CDK8/CycC con propiedades pre-farmaco.
4. Caracterizar de forma multifactorial a nivel bioquímico, celular y ADME-T los compuestos desarrollados en la fase de HtL para el desarrollo de inhibidores de CDK8/CycC. Selección de moléculas optimizadas para perfilado farmacológico.
5. Caracterizar de forma multifactorial a nivel bioquímico, celular y ADME-T de los compuestos desarrollados en la fase de LO para el desarrollo de inhibidores de CDK8/CycC. Selección de moléculas optimizadas para perfilado farmacológico.
6. Caracterizar el tipo de unión y determinar las constantes cinéticas de K_{on} , K_{off} y T_R de inhibidores optimizados y comparación con inhibidores de referencia.
7. Comparar las moléculas optimizadas seleccionadas tras perfilado multifactorial con inhibidores de referencia y selección de compuestos con perfil farmacológico para estudios *in vivo*

3. Materiales y métodos

3.1. Ensayos bioquímicos para la detección de la actividad de proteínas quinasas.

3.1.1. Ensayo quinasa de unión basado en la tecnología TR-FRET

La transferencia de energía por resonancia de fluorescencia resuelta en el tiempo (TR-FRET) (en inglés Time resolved fluorescence resonance energy transfer) es la combinación práctica de la fluorimetría resuelta en el tiempo (TRF) y la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia o también llamada transferencia lineal de energía (FRET), que fue descrita por Theodor Forster[249]. TR-FRET combina el bajo ruido asociado a TRF como la homogeneidad de los ensayos de FRET, dando lugar a un ensayo flexible, fiable, sensible, con elevada procesividad y una ratio menor de falsos positivos y negativos.

FRET es un fenómeno físico que ocurre solo a muy corta distancia entre dos estados de excitación electrónica de dos moléculas fluorescentes en las que la longitud de onda de emisión de una de ellas (donador de electrones) coincide con la de excitación de la otra (aceptor de electrones) (Fig. 30). Los métodos FRET se utilizan a nivel intra e inter molecular, en complejos macromoleculares en el intervalo de 10-100Å y han sido ampliamente adoptados para monitorizar una variedad de actividades bioquímicas que producen cambios en la proximidad molecular tales como las interacciones proteína-proteína, cambios conformacionales y actividades enzimáticas.

El valor de FRET es un número adimensional que se calcula como la relación entre la señal del aceptor y la señal del donador.

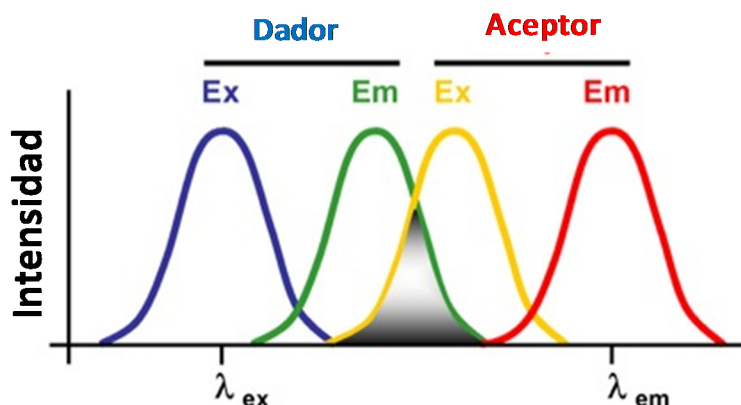


Figura 30: Tecnología FRET.

Espectros energéticos de dos moléculas que actúan como dador y aceptor de energía. Representación de la superposición de espectros de emisión del dador y de excitación del aceptor. Región de solapamiento (amarillo-fondo gris-verde) del espectro de emisión de uno de los fluoróforos, el donador (615nm) y espectro de excitación del fluoróforo aceptor de energía. Córscico y col.2003 (665nm)[249].

“LanthaScreen Eu Binding Assay” es un ensayo de unión basado en la tecnología FRET desarrollado por Invitrogen. El fundamento de este ensayo consiste en la unión de una molécula marcada con Alexa Fluor 647 llamada trazador al bolsillo del ATP de la proteína quinasa. El trazador actúa como una molécula aceptora de fotones, tras ser excitada con luz laser (a 337nm) dando lugar a la emisión de energía a una longitud de onda de 640nm. Esta molécula, presenta una alta homología estructural con la molécula de ATP, y por tanto se une con alta afinidad a la proteína con una cinética rápida de interacción.

El complejo quinasa-trazador, se detecta, usando un anticuerpo marcado con europio (especie donadora de energía, que emite energía a una longitud de onda de 615nm tras excitación con luz laser a 337nm). El anticuerpo se une al *Tag* de histidina o *Tag GST*. Por proximidad intramolecular entre el trazador (aceptor de energía) y el anticuerpo (donador de energía) se obtiene como resultado la emisión de FRET. Si en el medio existen moléculas con afinidad por el bolsillo de ATP, competirán con el trazador produciéndose un desplazamiento del fluoróforo que dará lugar a un decrecimiento de la señal óptica en forma de fluorescencia, proporcional a la concentración de dichas moléculas (Fig. 31). También se podrían detectar

moléculas que se unieran a un sitio alostérico y produjeran un cambio conformacional en la proteína que afectara a la unión del trazador.

A diferencia de la mayoría de los ensayos de actividad quinasa basados en fluorescencia, esta tecnología permite hacer lecturas de forma continua, y realizar estudios de cinética de interacción y determinar las constantes de velocidad de asociación (K_{on}) y disociación (K_{off}) y el tiempo de residencia de los inhibidores.

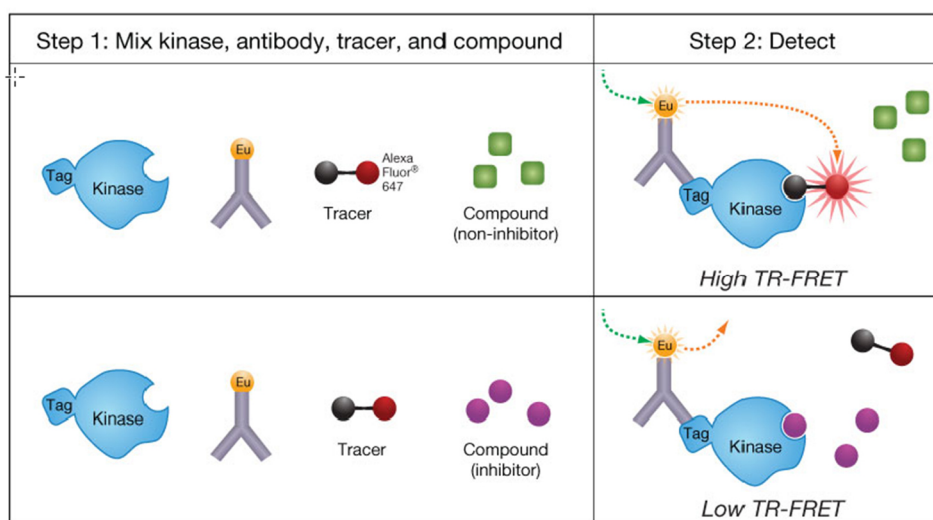


Figura 31. Fundamento general del ensayo "LanthaScreen Eu Binding Assay". Imagen obtenida de Invitrogen/ThermoFisher Scientific.

Esta tecnología se ha usado como ensayo primario para la identificación de inhibidores frente a CDK8 / CycC (de ahora en adelante abreviada como CDK8) durante la campaña de cribado así como en las diferentes etapas del proceso de desarrollo de fármacos. También, se ha utilizado como ensayo secundario para evaluar la selectividad de los compuestos en las siguientes isoformas de CDKs: CDK9/CycT, CDK7CycH/MAT1, CDK5/p25 y CDK19/CycC.

Todos los ensayos de CDKs en el ensayo de rutina se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ l en tampón 1x (50 mM HEPES pH7.5, 10 mM $MgCl_2$, 1mM EGTA y 0.01% Brij-35) en placas de 384 pocillos (Optiplate 384, PerkinElmer) y se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 60 minutos como tiempo final (Fig. 32A). Transcurrido este tiempo se

centrifugó la reacción durante 30 segundos a 1000 rpm y se procedió a la lectura de la placa en el lector Victor (Perkim Elmer). Las concentraciones de trazador, anticuerpo y enzima para cada ensayo se recogen en la Tabla 2.

La reacción se llevó a cabo en tres adiciones, en el siguiente orden: enzima, inhibidor o DMSO y trazador-anticuerpo, usando la plataforma robotizada de dispensación Biomek-FX (*Beckman-coulter*).

	CDK8/CycC	CDK19/CycC	CDK5/p25	CDK7/Cyc H/ MAT1	CDK9/CycT
Proteína (µg/ml)	0,125	0,5	1	1	0,5
Trazador 236 (nM)	10	20	50	150	30
Ac Eu-anti-His-Tag (nM)	1,5		1,5	1,5	1,5
Ac Eu-anti-GST-Tag (nM)		2			

Tabla 2. Condiciones bioquímicas del ensayo de CDKs.

Esta misma tecnología fue empleada para la determinación de las constantes termodinámicas (K_d y K_i) (Fig. 32B). Así como, para la determinación de las constantes de asociación (K_{on}) y disociación (k_{off}) y la determinación del tiempo de residencia, de los inhibidores candidatos seleccionados y optimizados en modo de lectura continua (Fig. 32C). El diseño experimental para la realización de los anteriores estudios, se basó en el método de dilución rápida (“Jump dilución”) [118] [250]. Se estudió la cinética de desplazamiento del complejo binario [EI] y se determinó la velocidad de disociación del complejo mediante el desplazamiento del inhibidor y la formación del complejo CDK8-trazador. La reacción fue monitorizada midiendo de forma continua el incremento progresivo de la señal FRET en función del tiempo. El experimento se llevó a cabo en placas de 96 pocillos (Optiplate ½ Area Plate, PerkimElmer) en un volumen final de 100µl/pocillo. Inicialmente se mezcló el inhibidor (a concentración 10x K_i) junto con la proteína CDK8 (a concentración 10x) en un volumen

inicial de 10 μ l, la mezcla se preincubó durante 1 hora a TA para permitir la formación del complejo [EI]. Posteriormente, se añadieron 90 μ l del trazador a concentración 10x su K_d (para favorecer un nivel de ocupación máximo del trazador, entorno al 90%) y tras agitación y homogeneización, inmediatamente se procedió a la lectura continua y monitorización de la señal FRET indicando un incremento progresivo de recuperación de la misma, por desplazamiento del complejo CDK8-Inhibidor

La cinética del ensayo fue monitorizada durante 5 horas tomando lecturas a intervalos de 60 segundos. Los datos se exportaron al “software” GraphPad Prism y se aplicó la Ecuación “one phase association” empleada para el análisis y la determinación de la constante de velocidad de disociación observada (k_{obs}) [251][252], donde posteriormente se determinaron los valores de k_{on} y k_{off} y el tiempo de residencia ($T_R = 1/k_{off}$) cuyas ecuaciones están recogidas en el apartado de análisis de datos 3.1.5.2.

Además el método de lectura continua se utilizó para evaluar el tipo de unión de los inhibidores, rápida o lenta, estudiando la variación de la IC_{50} a lo largo del tiempo (Fig 32D).

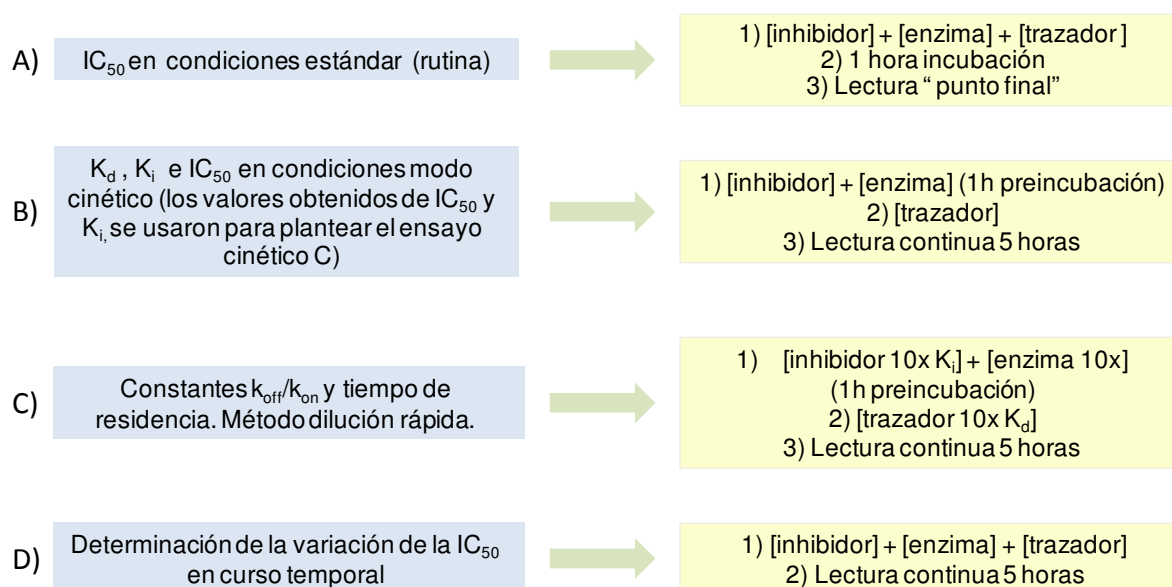


Figura 32. Diseño experimental de los diferentes ensayos realizados con la tecnología de LantaScreen Eu binding assay.

3.1.2 Ensayo de actividad quinasa basado en la tecnología FRET

El fundamento de este ensayo está basado en los mismos principios de la tecnología TR-FRET descritos en apartado 4.1.1. A diferencia del ensayo de unión lanthascreen, éste es un ensayo de actividad catalítica donde se detecta la actividad enzimática cuantificando la fosforilación de un sustrato genérico de serín/treonín quinasas como es el 4EBP1-GFP (Fig. 33).

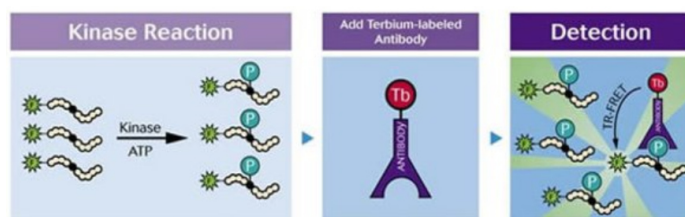


Figura 33. Esquema general del ensayo LanthaScreen Eu Kinase Assay. Imagen obtenida de Invitrogen/ThermoFisher Scientific.

La detección de la actividad enzimática se produce al unirse un anticuerpo específico Anti-4EBP1-P a los residuos fosforilados en serina o treonina del sustrato 4EBP1-GFP. El anticuerpo marcado con terbio (Tb) es la especie donadora de energía (longitud de onda de emisión 495nm), se une a los residuos de serina o treonina del sustrato fosforilado marcado con fluoresceína o GFP (Green fluorescent protein), que es la especie aceptora que tras ser excitado a 340nm emite a una longitud de onda de 520nm. Por proximidad entre las dos moléculas, se produce transferencia de energía y la emisión de energía en forma de FRET. La cuantificación de la reacción quinasa, se determina por la unión específica del anticuerpo al sustrato fosforilado detectada por un incremento de la señal FRET. Si en el medio de la reacción existen moléculas inhibitoras de la actividad quinasa, el sustrato no se fosforila observándose un decrecimiento del valor de FRET, que se cuantificará respecto al control del ensayo sin inhibidor, que representa el 100% de actividad.

Este ensayo se utilizó para evaluar la selectividad de los compuestos en las siguientes CDKs: CDK1/CycB, CDK2/CycA, CDK4/CycD1 y CDK6/CycD1. Como sustrato genérico se usó 4EBP1-GFP y el anticuerpo anti-p4EBP1[pThr46] marcado con Tb para detectar su fosforilación.

El ensayo de actividad fue elegido como alternativa al ensayo de “LanthaScreen binding”, porque con dicha tecnología no se obtuvo suficiente sensibilidad ni buena ventana de ensayo (relación señal/ruido), entendiendo ésta como la relación entre la señal del ensayo con proteína (control positivo) y la señal del ensayo sin proteína (control negativo). Encontrándose por debajo del nivel de aceptación que se estableció como nivel de fiabilidad y robustez.

El ensayo se realizó en dos pasos. Primero tuvo lugar la reacción enzimática que se llevó a cabo en un volumen final de 20µl de tampón general de quinasas (15mM HEPES pH7.5, 20mM NaCl, 1mM EGTA, 0.02% TWEEN 20, 10mM MgCl₂, 0.1mg/mL BGG suplementado con 2mM DTT) en placas Optiplat 384 incubándose a TA, durante 60 minutos. Las condiciones de ensayo de la quinasas, sustrato, ATP y anticuerpo se recogen en la Tabla 2 para cada CDK. En segundo lugar se realizó la detección de la reacción que se llevó a cabo añadiendo 10µl a cada pocillo de una mezcla de 20mM de EDTA para parar la reacción y 4nM de anti-4EBP1-P, en tampón de dilución de anticuerpo (tampón de dilución TR-FRET, Invitrogen). Se incubó la reacción durante 60 minutos a TA, protegido de la luz. Transcurrido este tiempo se centrifugó la reacción durante 30 segundos a 1000 rpm y se procedió a la lectura de la placa en el lector Victor (Perkin Elmer). La dispensación de los reactivos se realizó en la plataforma robotizada Biomek-FX (Beckman-coulter).

	CDK1/CycB	CDK2/CycA	CDK4/CycD1	CDK6/CycD1
Proteína (µg/ml)	0,2	0,3	1,5	0,4
Sustrato 4EBP1-GFP (nM)	70	70	50	50
ATP (µM)	15	35	300	400
Ac Anti-P4EBP1[pThr46] (nM)	4	4	4	4

Tabla 3. Condiciones bioquímicas del ensayo de actividad de CDKs.

3.1.3. Ensayo de actividad basado en la tecnología ADP-Glo™

ADP-GLO™ es una tecnología, adecuada para aplicaciones en *HTS*, que mide la actividad quinasa en un ensayo acoplado a un sistema de reacciones enzimáticas secundarias que cuantifican el ADP producido durante la reacción enzimática [253]. Este es un ensayo homogéneo, con alta sensibilidad y universal, que tiene aplicabilidad tanto para quinasas como ATPasas y también es usado para cuantificar la auto-fosforilación de quinasas en residuos específicos que actúan como sus propios sustratos, en estos casos en la reacción solo interviene la enzima y el ATP.

El ensayo se desarrolló en tres pasos. En primer lugar, se añadió la enzima, el sustrato y el ATP para que tuviera lugar la reacción enzimática. En segundo lugar se eliminó el ATP no hidrolizado remanente y en tercer lugar, se convirtió el ADP (subproducto de reacción enzimática) en ATP. La luciferina (sustrato) junto con el ATP en presencia de oxígeno y luciferasa se transforma en oxiluciferina, que al ser excitada a 340 nm produce la emisión de una señal bioluminiscente que es proporcional a la actividad enzimática (Fig. 34).

La tecnología de ADP-Glo se utilizó para evaluar la actividad quinasa de HASPIN con los inhibidores de CDK8 identificados. HASPIN es una quinasa que tiene la propiedad de autofosforilarse en los residuos serina y treonina, por tanto aprovechando esta propiedad de la enzima, se diseñó un ensayo sin sustrato para evaluar la inhibición su autofosforilación, e

identificar los inhibidores de esta enzima. El ensayo quinasas, se llevó a cabo en un volumen final de 15 μ l en tampón general de quinasas (15mM HEPES pH7.5, 20mM NaCl, 1mM EGTA, 0.02% TWEEN 20, 10mM $MgCl_2$, 0.1mg/mL BGG) a una concentración de enzima de 0.9 μ g/ml y 150 μ M de ATP.

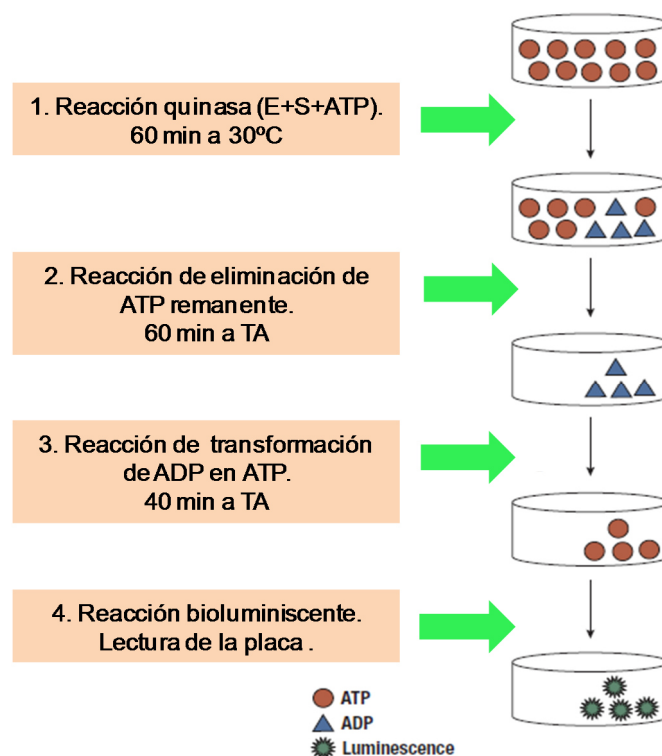


Figura 34. Principio y diseño experimental del ensayo de ADP-GLO™. Imagen obtenida de Promega Corporation.

El ensayo se realizó en placas 384 pocillos (Optiplat, Perkin Elmer), previa centrifugación durante 1 minuto a 1000rpm y posteriormente se incubó la reacción a 30°C durante 60 minutos.

Una vez completada la reacción quinasas para la detección de la actividad se añadieron 7.5 μ l de reactivo “R” (kit ADP-Glo™, Promega) para detener la reacción quinasas y eliminar el ATP no hidrolizado del medio dejando sólo el ADP como subproducto. Se centrifugó en las

mismas condiciones que el paso anterior, y se incubó durante 1 hora a TA. Posteriormente, se añadieron 15µl de reactivo de Detección “D” (kit ADP-Glo™) para la conversión de ADP en ATP acoplándose al sistema luciferin/luciferasa, y se incubó durante 40 minutos a TA. Finalmente, se procedió a la lectura de la placa en lector EnVision (PerkinElmer). La dispensación de todos los reactivos, se llevó a cabo en la plataforma robotizada Biomek-FX (Beckman-coulter).

3.1.4. Diseño de placas de ensayo y criterios de calidad del ensayo.

La evaluación de los inhibidores sintetizados por el grupo de química médica en todos los apartados del proceso de descubrimiento de fármacos (generación de moléculas punto partida o hits, optimización de hits y optimización de compuestos candidatos a fármacos), fue evaluada en todos las quinasas referidas, en formato de ensayo de dosis respuesta a una concentración inicial de compuesto de 10µM al 1% de DMSO partiendo de una concentración de compuesto de 10mM o 1mM al 100% de DMSO conservado a -40°C. A partir de estos experimentos se determinó el porcentaje de inhibición a cada concentración de compuesto y la IC₅₀ [254].

La IC₅₀ representa la dosis molar para la cual se obtuvo el 50% de inhibición de la enzima. Los datos brutos obtenidos en los lectores EnVision o Victor (PerkinElmer) se exportaron al programa de gestión de datos Pipeline (Accelrys), donde mediante algoritmos, se relacionó la posición de los compuestos de las placas virtuales creadas por el propio programa con los datos obtenidos en los lectores. Posteriormente los datos fueron tratados con el software Activity Base (IDBS Ltd.) donde se procesaron y analizaron los datos en crudo mediante algoritmos de ajuste de curvas para el cálculo de la potencia de los inhibidores en valores de IC₅₀ o en porcentaje de inhibición en su defecto, respecto a los controles del ensayo. La IC₅₀ se calculó usando el modelo matemático para el análisis de la curva modelo 205 con 4 parámetros logísticos del software Activity Base.7.4.2.4

La configuración de la placa de ensayo, es decir, la disposición de los inhibidores, los controles del ensayo (controles positivos y negativos) y los controles de referencia con inhibidores conocidos, se dispusieron siempre siguiendo la misma plantilla. Esto permitió que las placas de ensayo pudieran ser procesadas de forma automatizada y con trazabilidad de las posiciones de las muestras virtuales previamente generadas por el sistema de gestión de compuestos y los datos experimentales obtenidos en el lector de placas (Fig. 35).

En la Fig. 35A se muestra una plantilla de 4 cuadrantes de una placa de 384 usada en los cribados de librerías para identificar inhibidores de CDK8. En ella se representan, por un lado, las posiciones de las muestras a ensayar en las columnas 3-22 en formato de ensayo a punto simple y por duplicado. Los controles negativos (sin enzima) se dispusieron en las columnas 23-24/filas A-H, y los controles positivos (con enzima) se localizaron en las columnas 23-24/filas I-P.

En las columnas 1-2/filas A-P se localiza el control de inhibición del compuesto de referencia, que se testa por duplicado en dosis respuesta (DR).

En la Fig. 35B se muestra la plantilla para ensayos de DR, donde la única diferencia con la anterior es que los compuestos se localizan en las filas de la 5-22. Cada concentración se ensaya por duplicado y un compuesto por cada fila. Este formato de placa de DR incorpora dos compuestos de referencia en las columnas 1-4/filas A-P. Así por placa, en un formato de punto simple por duplicado se testaron 88 compuestos o en un formato de DR se analizaron 16 compuestos en diluciones seriadas al 1/3 por duplicado. La dispensación automatizada de los compuestos se realizó por cuadrantes en modo de dispensación Z: primer cuadrante columnas A1 a la A23 alternando una, segundo cuadrante columnas A2 a la A24 alternando una, tercer y cuarto cuadrante columnas B1 a la B23 y de la B2 a la B24 respectivamente.

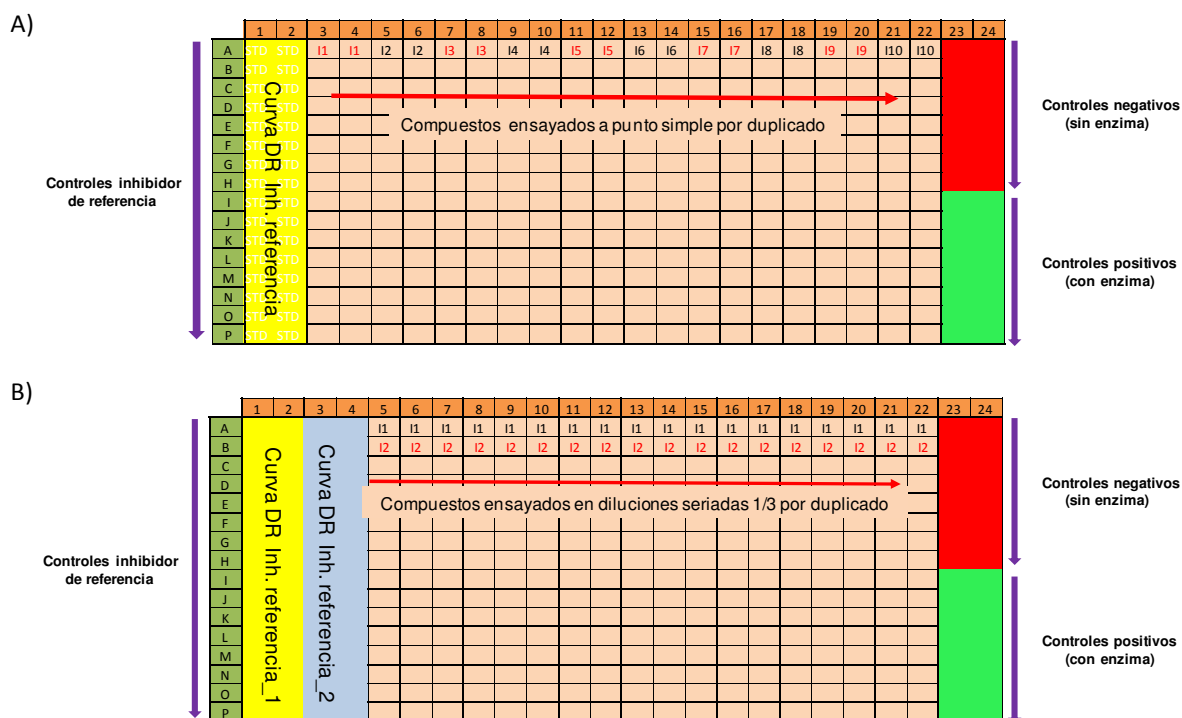


Figura 35. Configuración del formato de placa de ensayo de 384 pocillos. A) Para ensayos de punto simple. B) Para ensayos de DR.

En la Tabla 4 se presentan los inhibidores de referencia (estándares) que se utilizaron como controles internos de calidad y reproducibilidad de los valores de IC_{50} para los diferentes ensayos bioquímicos.

Inhibidor de Referencia	Ensayo	Tipo agente
Flavopiridol	CDK1, CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK8, CDK9, CDK19	Pan-CDK
Sorafenib	CDK4, CDK5, CDK6, CDK8	Multiquinasa
BS-181	CDK7	CDK7 selectivo
Referencia interna (ETP-078)	CDK9	Sintetizado en el CNIO*
Referencia interna (ETP-670)	CDK19	Generado en el CNIO
Referencia interna (ETP-010)	HASPIN	Generado en el CNIO
CHR-6494	HASPIN	Multiquinasa

Tabla 4. Relación de inhibidores usados como estándar en los diferentes ensayos bioquímicos . Németh y col.2011.*[255]

Para la determinación de la calidad de los ensayos, se calcularon la Z' y la ventana del ensayo (S/B). De acuerdo a los criterios establecidos, los ensayos se aceptaron o se rechazaron según la Tabla 5 [256] [257]. [255].

El Factor Z' es un parámetro estadístico que estima la variabilidad del ensayo y por tanto su robustez [256][258]. Se calcula aplicando la Ecuación 1.

$$Z' = 1 - \frac{3SD \text{ de la muestra} + 3SD \text{ del control}}{\text{media de la muestra} - \text{media del control}} \quad (\text{Ec 1})$$

La ventana del ensayo (S/B) es un parámetro que relaciona los valores de la señal del control positivo y el negativo (sin enzima), indicándonos el rango dinámico del ensayo y la fiabilidad del mismo para discriminar entre compuestos activos e inactivos.

$$\frac{S}{B} = \frac{\text{Media de la señal del control positivo}}{\text{Media de la señal del control negativo}} \quad (\text{Ec 2})$$

Criterios de calidad del ensayo: Factor Z' y ventana del ensayo (S/B)	Criterios de aceptación y límites prefijados	
$1=Z'$	Ensayo ideal	
$1 \geq Z' \geq 0,5$	Ensayo excelente	
$0,5 \geq Z' \geq 0$	Ensayo crítico	Alta variabilidad (inaceptable)
$S/B \geq 2$	Buena ventana	
$S/B \leq 2$	Ventana crítica	Baja fiabilidad (inaceptable)

Tabla 5: Criterios de calidad de un ensayo.

3.1.5. Análisis de los datos

3.1.5.1. Análisis de los datos en crudo obtenidos con las diferentes tecnologías.

En el empleo de la tecnología TR-FRET la señal de fluorescencia obtenida correspondía a los dos canales de emisiones de los dos fluoróforos. En primer lugar para cada muestra se normalizó la señal aplicando la Ecuación 3 que relaciona la intensidad de los dos fluoróforos. Posteriormente, se aplicó la Ecuación 4 y 5 para calcular el porcentaje de emisión y determinar el valor de la IC₅₀ respectivamente.

$$\text{ratio de emisión} = \frac{\text{Intensidad de la señal del fluoróforo aceptor}}{\text{Intensidad de la señal del fluoróforo donador}} \times 1000$$

(Ec.3)

En las tecnologías donde obtuvimos una señal directa, bien de fluorescencia (no FRET) o bien de luminiscencia, se aplicaron directamente las ecuaciones 4 y 5, sobre los datos brutos para calcular el porcentaje de inhibición y determinar el valor de la IC₅₀.

La Ecuación 4 se aplicó a todos los ratios obtenidos en las diferentes posiciones de la placa para obtener los porcentajes de inhibición de las muestras ensayadas, y también a los controles positivos y negativos del ensayo que corresponden respectivamente al 100% de señal y a la ruidos del ensayo.

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \left(\frac{\text{ratio del inhibidor} - \text{ratio del control negativo}}{\text{ratio del control positivo} - \text{ratio del control negativo}} \times 100 \right) \quad (\text{Ec.4})$$

Para determinar la potencia de un inhibidor el parámetro que se calculó fue la IC₅₀, que es la concentración de inhibidor que reduce en un 50% la actividad de la enzima [237][244][259]. Se aplicó a este fin, la Ecuación 5, que relaciona el porcentaje de inhibición frente a la concentración de inhibidor, ajustándose a una curva logarítmica con pendiente variable (modelo 205 de regresión no lineal, Ecuación de cuatro parámetros logísticos del software Activity Base) y cuya representación corresponde a la Fig. 36.

$$Y = A + ((B - A)/(1 + C/X))^D \quad (\text{Ec.5})$$

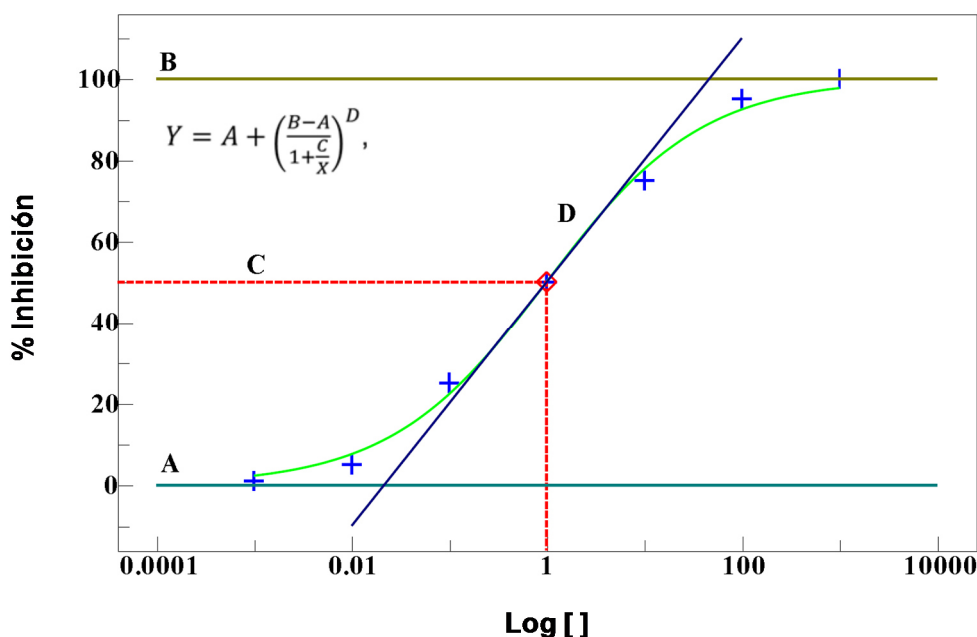


Figura 36. Representación de la función matemática utilizada para determinar la IC_{50} .

Donde Y es el porcentaje de inhibición, A el valor mínimo (ajustado a 0), B el valor máximo (ajustado a 100), C es la IC_{50} y D la pendiente de la curva. Imagen obtenida del programa pipeline CNIO

La K_i , es la constante de disociación en equilibrio para un inhibidor en una conformación específica de la enzima[242], se interrelaciona con la IC_{50} mediante la Ecuación de Cheng-Prusoff (Ec.6) [259] [260][261]. [262].

$$K_i = IC_{50}/(1 + L/K_d) \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde, L es el ligando (trazador) y K_d la constante de afinidad del trazador .

La Ecuación de Cheng-prusoff,[263] se aplica cuando se cumplen alguno de estos requisitos: i) si $[E] \ll [Trazador]$; ii) Si $[E] \ll [K_d]$.y iii) si solo hay un sitio de unión (inhibidores competitivos) [260]. En nuestro caso, se cumplen los requisitos II y III.

3.1.5.2. Determinación de parámetros cinéticos.

La K_d se define como la constante de equilibrio de unión o constante de disociación. Determina la concentración de ligando que se une a la mitad de moléculas de receptor en condiciones de equilibrio. Las afinidades relativas de los diferentes complejos receptor-ligando

son inversamente proporcionales a los valores de K_d , que matemáticamente es la relación inversa de la afinidad del complejo receptor-ligando en condiciones de equilibrio ($K_d = 1/K_a$) donde K_a es la constante de asociación) [233]. Por tanto, cuanto más bajo es el valor de la K_d mayor es la interacción receptor-ligando y por tanto mayor es la afinidad del complejo [RL].

La K_d del trazador se determinó, en condiciones de concentración fija de enzima y concentraciones variables de trazador (ligando), aplicando la Ecuación 7 que corresponde a la ecuación de regresión no lineal, “one site specific binding” del programa *Graphad Prims 4* y cuya representación gráfica se muestra en la Fig.37.

$$Y = B_{max} \cdot X / (K_d + X) \quad (\text{Ec.7})$$

Donde, Y es la señal FRET obtenida para una concentración de ligando, B_{max} es el nivel máximo de ocupación de [RL] (unión máxima o máxima señal FRET) y X es la concentración de ligando.

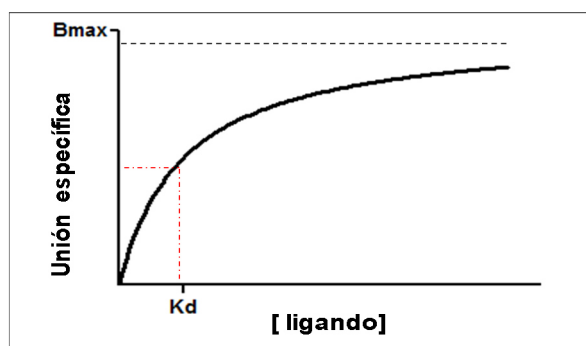


Figura 37. Representación de la función para determinar la K_d del trazador.

El eje x representa la concentración de trazador y en el eje y la señal total específica. La K_d representa el 50% de unión y es la constante de unión en equilibrio.

La k_{on} es una constante de velocidad de segundo orden, que cuantifica la velocidad de unión de un ligando con su receptor para formar un complejo binario, receptor-ligando [RL] (tasa de asociación de un ligando a su receptor o enzima), se expresa en unidades de concentración y tiempo ($M^{-1} \cdot s^{-1}$). La k_{off} es una constante de velocidad de primer orden que

cuantifica la velocidad a la que un complejo binario receptor-ligando [RL] se disocia a sus formas libres y se expresa en concentración (M^{-1}) [242].

El tiempo de residencia (T_R) o tiempo de vida medio ($t_{1/2}$) es el tiempo que un ligando se encuentra unido o interaccionando con su receptor o enzima (se expresa en segundos, minutos u horas).

Para poder calcular estos parámetros cinéticos en primer lugar hubo que calcular a partir de los datos experimentales la k_{obs} .

La k_{obs} es la tasa de asociación observada de asociación, depende de la concentración de ligando y está relacionada con la k_{off} mediante la Ecuación 8 [237][264][252].

$$k_{obs} = k_{off}(1 + K[L]) = k_{off}(1 + [L]/K_d) \quad (Ec.8)$$

Para obtener la k_{obs} para cada inhibidor se realizó el experimento de dilución rápida descrito en el apartado 4.1.1. Las señales obtenidas se ajustaron a una función exponencial (Ec.9 y Fig. 38), donde el eje y representa la señal obtenida (TR-FRET) y el eje x el tiempo de ensayo [265].

$$Y = Y_0 + (Plateau - Y_0) * (1 - \exp(-1 * k * x)) \quad (Ec.9)$$

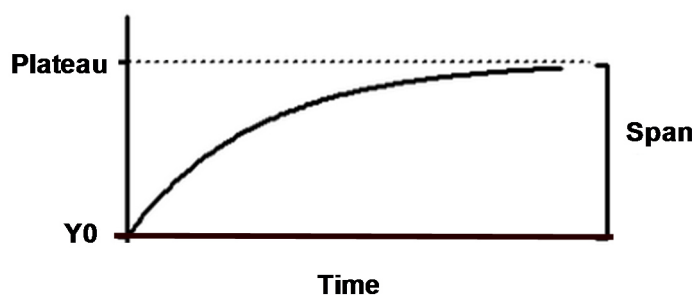


Figura 38. Representación de la función que describe la disociación del inhibidor (desplazamiento por el trazador) en función del tiempo.

Donde, Y_0 es el valor de Y a tiempo cero, $Plateau$ es el valor de Y a tiempo infinito (Y_{max}), K es la k_{obs} . Figura adaptada del programa GraphPad Prism 4.

Una vez calculada experimentalmente la k_{obs} , se obtuvo la k_{off} a partir de la Ecuación 10 [252]. Asumiendo un modelo simple de un solo paso donde $k_1 = k_{\text{on}}$ y $k_2 = k_{\text{off}}$ (Fig. 39)[235][239]. Por otro lado, la K_d está interrelacionada con la k_{off} y k_{on} , mediante la Ecuación 10. A su vez, el tiempo de residencia es la inversa de la k_{off} (Ec.11). Por lo tanto, aplicando las ecuaciones 10 y 11 se determinaron los valores de k_{on} y tiempo de residencia respectivamente [266][252][265].

$$k_{\text{on}} = (k_{\text{off}}) / K_d \quad (\text{Ec.10})$$

$$(T_R = \frac{1}{k_{\text{off}}}) \quad (\text{Ec.11})$$

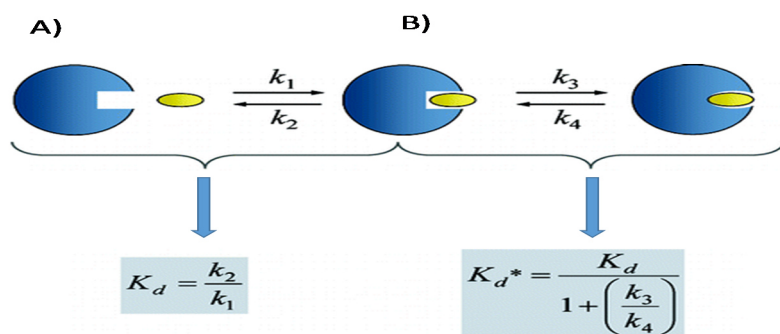


Figura 39. Modelo de interacción RL.

A) De un solo paso. B) De dos pasos (cambio conformacional del R) Figura adaptada de. Tummino y col. 2008 [240]

3.2. *Selectividad en un amplio panel de quinasas, KINOMEScan™*

El estudio de selectividad de los compuestos en un panel amplio de quinasas se externalizó a la compañía Discoverx (actualmente Eurofins) que posee una plataforma de cribado KINOMEScan™ y que emplea un ensayo de unión de competencia dirigida al sitio activo de la quinasa para medir cuantitativamente las interacciones entre los compuestos y más de 450 quinasas humanas, así como variantes mutantes que son relevantes en diferentes enfermedades.

Los ensayos de KINOMEscan™ son ensayos de binding y por lo tanto proporcionaron datos de afinidades de interacción termodinámica.

La técnica empleada se fundamenta en un ensayo de competencia, entre la interacción de la quinasa con el inhibidor o una molécula con alta afinidad y la conjugación de la quinasa con un ligando inmovilizado en un soporte sólido. Los compuestos que presentan afinidad por el centro activo de la quinasa bien por el sitio del ATP, bien de forma alostérica evitarán la unión de la quinasa al ligando inmovilizado y por tanto la cantidad de quinasa capturada en el soporte sólido será bajo. Por el contrario si los compuestos no interaccionan con la quinasa, por baja afinidad, la cantidad de quinasa conjugada con el soporte sólido será alta.

Los compuestos con afinidad por las quinasas se identificaron midiendo en el soporte sólido la cantidad de quinasa conjugada en las muestras tratadas con compuesto en relación con los control tratadas con DMSO sin compuesto. La cuantificación se realizó con un método de qPCR cuantitativo, preciso y ultrasensible que detectó una sonda de ADN marcado específicamente en cada quinasa. Los compuestos se testaron a punto simple a una concentración de 1 μ M.

La casa comercial reportó el porcentaje de señal remanente respecto al control tratado con DMSO para cada quinasa. Y con estos porcentajes se calculó el ratio de selectividad o “selectivity score” que es una medida cuantitativa de la selectividad del compuesto.

Se calculó dividiendo la cantidad de quinasas a las que se unieron los compuestos por el número total de quinasas distintas analizadas, excluidas las variantes mutantes. En nuestro caso se consideró el S(35) que se determinó dividiendo el número de quinasas no mutantes con una señal respecto al control inferior al 35% dividido por el número de quinasas no mutantes testadas. Como más cercano a 0 estuviera el S(35) más selectivo era el compuesto, para un cabeza de serie un S(35) inferior a 0,1 se consideró muy selectivo.

3.3. Ensayos celulares.

3.3.1. Mantenimiento y conservación de líneas celulares tumorales.

Los ensayos celulares se realizaron con las líneas de leucemia mieloide aguda MV4-11 y MOLM-13, la línea de cáncer de mama triple negativo MDAMB-231 y la línea de cáncer de colon SW620 y HCT116, todas ellas procedentes de la ATCC (“American Type Culture Collection”). Las líneas de mama y colon son adherentes y crecían en monocapa y las líneas de leucemia en suspensión. Todas ellas se cultivaron en frascos de 75cm², se incubaron a 37°C en atmósfera con 5%CO₂. Se crecieron en medio RPMI (Sigma) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB, Sigma) y un 0.01% de penicilina-estreptomicina (Gibco).

Todos los productos utilizados para cultivos celulares se obtuvieron de SIGMA. Las líneas se congelaron en medio con 10% SFB y 10% DMSO en nitrógeno líquido. Su crecimiento y morfología se controlaron bajo el microscopio.

Para el mantenimiento de los cultivos y el conteo de las células se siguió el siguiente protocolo. Las células adherentes se recolectaron mediante la adición de 2-3 ml de tripsina y se dejó actuar durante 5 minutos a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% CO₂. Transcurrido ese tiempo, se añadió un volumen de 10ml de medio de cultivo para neutralizar la acción de la tripsina. La mezcla se recogió en un tubo de 15ml y se centrifugó a 1200 rpm 5 minutos y se desechó el sobrenadante. Tras lavar las células con PBS se resuspendieron en 10ml de medio de cultivo y una alícuota de 100 µl se utilizó para determinar el número de células por mililitro mediante en el contador de células (Beckman). Las células en suspensión, cada 3 días, se renovó el medio y se realizó una dilución 1:3 en frascos de 75cm².

3.3.2. Ensayo reportero de actividad β -CATENINA.

Con el fin de evaluar la modulación de CDK8 en células se realizó un ensayo de actividad β -CATENINA basado en un reportero de luciferasa Topflash. Las células HCT116

fueron sembradas en medio RPMI en placas de 96 pocillos (Poly-D-Lysine Cell ware 96 well plates, Becton Dickinson Falcon microplates) en un volumen de 100µl (10.000 células/pocillo) y se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% CO₂. Al día siguiente, las células se transfectaron con el sistema Topflash (TCF “Reporter Plasmid Kit”, Merck) con el reactivo de Effectene (Qiagen) siguiendo las instrucciones del vendedor. Y se incubaron durante 5h con los complejos de transcripción a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente se añadieron los inhibidores a diferentes concentraciones en diluciones seriadas 1/3, comenzando a una concentración de 10µM en 1% de DMSO y se incubaron durante toda la noche.

Tras la incubación, se determinó la actividad luciferasa utilizando el reactivo dual Glo-Luciferase (Promega) siguiendo las instrucciones del vendedor. Tras 2h de adición de los reactivos se leyó la placa en el lector Victor (Perkin Elmer) usando el protocolo de luminiscencia. Los datos brutos se procesaron como se detalla más adelante y se analizaron en Activity Base (IDBS) aplicando las ecuaciones descritas para determinar la IC₅₀ bioquímica (apartado 3.1.5.1). En este caso se calculó la EC₅₀ (concentración efectiva que reduce al 50% de la señal experimental, respecto al control de células tratadas con DMSO que se consideró el 100% de actividad luciferasa).

En la placa de ensayo se incluyeron diferentes controles (Fig. 40):

- El control del medio, localizado en la fila 1 y la fila 2 columnas E-H, que corresponde a la señal de fondo del ensayo que proporciona el medio de cultivo, sin la presencia de las células. Esta señal se restó de la señal total en todos los pocillos.
- El control positivo, localizado en la fila 2 columnas A-D y la fila 12, que corresponde a células sin inhibidor pero con DMSO, que se consideró el 100% de actividad β -CATENINA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Medio	Control +	I1	I1	I1	I1	I1	I1	I1	I1	I1	Control +
B	Medio	Control +	I1	I1	I1	I1	I1	I1	I1	I1	I1	Control +
C	Medio	Control +	Compuestos ensayados en diluciones seriadas 1/3 por duplicado									Control +
D	Medio	Control +										Control +
E	Medio	Medio										Control +
F	Medio	Medio										Control +
G	Medio	Medio										Control +
H	Medio	Medio										Control +

Figura 40. Diseño del formato de placa para ensayos reporteros de actividad β -CATENINA.

3.3.3. Ensayo de modulación de los biomarcadores de CDK8 y de HASPIN por immuno blot.

Tratamiento con inhibidores. Las células SW620 adherentes fueron sembradas en medio RPMI en placas de 6 pocillos (*Becton Dickinson Falcon microplates*) en un volumen de 2 ml (250.000 células/pocillo), durante 24 horas. Posteriormente se añadieron los inhibidores a diferentes concentraciones en diluciones seriadas 1/3, comenzando a una concentración de 10 μ M en 1% de DMSO.

Obtención de lisados: Transcurridas 8 horas de tratamiento se procedió a lisar las células. En primer lugar, se aspiró el medio de cada pocillo. Después, se lavaron con PBS (2ml/pocillo) y se añadieron 50 μ l de tampón de lisis frío (62.5Mm, Tris pH 6.8, 2% SDS y 10% glicerol).

Tras incubar las placas durante 5 minutos en hielo se despegaron mediante “*cell scrape*”. Posteriormente, los lisados se centrifugaron a 13000rpm durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un vial nuevo y se tomó una alícuota para determinar la concentración de proteínas por el método *Bradford*.

Electroforesis y Western blot: la inmunodetección de proteínas sobre membranas de nitrocelulosa (Millipore) se realizó de acuerdo al protocolo estándar. Los extractos de proteínas

se sometieron a electroforesis en geles de acridamida desnaturalizantes SDS-PAGE del 7.5 o 15%, en tampón de electroforesis Tris–glicina, 1x (Lonza). y fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa, utilizando un equipo MiniTrans-blot Cell (BioRad). La transferencia se realizó a 150mV durante 1 o 1'5 h, en tapón de transferencia (TrisHCL 0.025M, Glicina 0.2M, 20% metanol). Las membranas se bloquearon para evitar uniones inespecíficas durante 1h en agitación lenta en tampón de bloqueo (*Odyssey Blocking buffer* en PBS 1:1, LI-COR). A continuación, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente: Anti STAT1-Ser727 (Cell Signaling), anti STAT1 (Cell Signaling), Anti H3-Thr3 (*Millipore*) y anti H3 (Cell Signaling) dilución 1:1000 a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, tras varios lavados con TBS-T (TBS, 0.1% Tween20 y 1% BSA), se adicionó el anticuerpo secundario anti conejo conjugado con Alexa 680 (*Life- technology*) y el anti ratón conjugado con Alexa 800 (*Thermo Fisher SCIENTIFIC*) a una dilución 1:5000 1h a TA. Tras tres lavados de la membrana con TBS-T, se procedió a visualizar las bandas de proteína mediante el sistema Odyssey (LI-COR) que genera imágenes a partir de excitación y emisión de moléculas fluorescentes en el rango cercano al infrarrojo.

Se cuantificó tanto la proteína fosforilada como la proteína total con el programa *Odyssey (Imagen Study ver 5.2)*. Estableciéndose un ratio de proteína fosforilada respecto a la proteína total, asignando el 100% de señal al valor del control positivo (células tratadas con DMSO).

El cálculo se determinó refiriendo la señal de cada concentración de inhibidor a la señal del DMSO y a partir de este valor se calculó el porcentaje de inhibición de cada concentración aplicando la Ecuación (Ec.12). Se determinó la EC₅₀ con el programa XL-FIT. Los datos experimentales se ajustaron a una curva sigmoidea aplicando el modelo 205 de 4 parámetros logísticos y ajustando la parte superior e inferior de la curva a los datos experimentales.

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \left(\frac{\text{valor de la muestra}}{\text{valor del control positivo}} \times 100 \right) \quad (\text{Ec.12})$$

3.3.4. Ensayo de viabilidad celular.

Para evaluar el efecto en la proliferación celular de los compuestos se realizó un ensayo de viabilidad celular mediante el método CellTiter-Glo (Promega). Este es un ensayo homogéneo luminiscente que mide el número de células vivas en el cultivo en función de la cantidad de ATP presente como medida de la actividad metabólica celular. La disminución de la cantidad de ATP detectado se relaciona con la pérdida de viabilidad celular. El ATP se cuantifica por una reacción acoplada al sistema luciferin/ luciferasa que emite bioluminiscencia.

Los ensayos de viabilidad celular se realizaron con las líneas leucemia mieloide aguda MV4-11 y MOLM-13, la línea de cáncer de mama triple negativo MDAMB-213 y la línea de cáncer de colon SW620. Para llevar a cabo los distintos tratamientos con los compuestos se sembraron las células en placas de 96 pocillos (Becton Dickinson Falcon Microplates) a una densidad celular de 5000 células/pocillo para las células adherentes y 10000 células/pocillo para las células en suspensión en un volumen de 200ul/pocillo. Las células se mantuvieron durante 24h en cultivo para que se adhirieran a la placa, después se añadieron 2μl del compuesto al 1% en DMSO a una dilución 1:100 la concentración final de ensayo y se incubaron durante 72 horas a 37 °C y atmósfera de CO₂ al 5%. Después, se sacaron del incubador y se dejaron a TA durante 15 minutos posteriormente se añadieron 50μl/pocillo de reactivo CellTiter-Glo, y se homogenizó el contenido durante 15 minutos en un agitador orbital para inducir la lisis celular. Finalmente se leyó la placa en el lector EnVision (Perkin Elmer) usando el protocolo de luminiscencia. Los datos brutos se procesaron como se detalla más adelante y se analizaron en Activity Base (IDBS) aplicando las ecuaciones descritas para determinar la IC₅₀ bioquímica (apartado 4.2.6). En este caso se calculó la GI₅₀ (concentración que reduce al 50% la viabilidad

celular, respecto al control de células tratadas con DMSO que se consideró el 100% de viabilidad).

En la placa de ensayo se incluyeron diferentes controles (Fig. 41). El control del medio, localizado en la fila 1, que corresponde a la señal de fondo del ensayo que aporta el medio de cultivo solo sin la presencia de las células y que se descontó de la señal total en todos los pocillos. El control positivo, localizado en la fila 2, que corresponde a células sin inhibidor pero con DMSO que se considera el 100% de viabilidad celular. Y por último el control sin DMSO, localizado en la fila 12 columnas A-D, que se compara con las células tratadas con DMSO, localizado en la fila 12 columnas E-H para comprobar que el DMSO por sí solo no le es tóxico a las células.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Medio	Control +	I1	I1	I1	I1	I1	I1	I1	I1	I1	Control sin DMSO
B	Medio	Control +	I1	I1	I1	I1	I1	I1	I1	I1	I1	Control sin DMSO
C	Medio	Control +										Control sin DMSO
D	Medio	Control +	Compuestos ensayados en diluciones seriadas 1/3 por duplicado									Control sin DMSO
E	Medio	Control +										Control con DMSO
F	Medio	Control +										Control con DMSO
G	Medio	Control +										Control con DMSO
H	Medio	Control +										Control con DMSO

Figura 41. Diseño del formato de placa para ensayos de viabilidad celular.

Mediante la Ecuación 13 se calculó el porcentaje de proliferación de las células tratadas con inhibidores, tomando como referencia el control positivo sin inhibidores pero con DMSO como el 100% de viabilidad celular.

$$\% \text{ proliferación} = 100x \left(\frac{\text{Raw data} - \text{media medio}}{\text{media control positivo} - \text{media medio}} \right) \quad (\text{Ec.13})$$

3.3.5 .Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.

La citometría de flujo es una tecnología que permite medir diversos parámetros celulares como antígenos de superficie, citoplasmáticos y nucleares, contenido de ácidos nucleicos, actividad enzimática, flujo de calcio, potencial de membrana y pH entre otros.

El principio básico de la citometría de flujo es la medición de un gran número de células, en forma individual, en un período muy corto de tiempo mientras se desplazan en un sistema de flujo o torrente líquido. Cada célula pasa por un punto donde son impactadas por un láser, que emite fluorescencia a una longitud que depende de cada tipo de láser, y cuya luz es desviada o alterada de acuerdo a características propias de cada célula. Si además a estas células se les incorporan moléculas fluorescentes, que son excitadas y alteradas por el láser, emitiendo una respuesta fluorescente en una longitud de onda mayor, se facilita la identificación de subgrupos específicos dentro de las grandes poblaciones celulares. Estas moléculas fluorescentes pueden estar acopladas a anticuerpos monoclonales específicos en solución.[267].

Esta técnica permite evaluar el contenido de ADN y las diferentes fases del ciclo celular, utilizando fluorocromos en solución, capaces de unirse estequiométricamente al ADN y ARN de las células, intercalándose en la doble hebra de ácidos nucleicos (Ioduro de propidio, IP) (Fig. 42).

El Objetivo de este análisis fue estudiar como afectaban los compuestos a la distribución de las diferentes fases del ciclo.

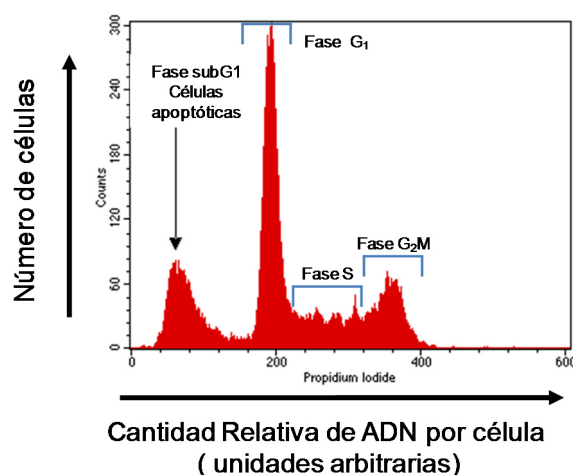


Figura 42. Distribución de las poblaciones celulares en las fases del ciclo.

Determinación por citometría de flujo de células marcadas con IP, agente intercalante que produce una señal de fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN que contiene cada célula y en cada fase del ciclo. Citómetro modelo FACScalibur

Se estudió la modulación del ciclo celular en la línea MV4:11. En primer lugar, se sembraron 1.000.000 de células por pocillo en un volumen de 3 ml/pocillo en placas de 6 pocillos (Becton Dickinson Falcon microplates) y se incubaron durante 1 hora a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. A continuación se añadieron los compuestos a la concentración deseada en 1% de DMSO. Tras 24 horas de incubación se recolectaron las células y se centrifugaron a 1250 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente lavándose posteriormente con PBS. Para la fijación de las células se resuspendieron en 1ml de etanol al 70% en PBS frío (-20°C) añadido lentamente en agitación suave (300rpm). Para su marcaje y análisis en el citómetro, se centrifugaron las células a 1250 rpm durante 5 minutos a 4°C, se lavaron con PBS refrigerado y se resuspendieron en 500µl de una mezcla de PBS que contenía RNasa a 0,2mg/ml y IP 20µg/ml, se homogeneizó suavemente, se transfirió la mezcla a un tubo de 5 ml y se incubó durante 30 minutos a TA, protegido de la luz. Las células se analizaron con el citómetro de flujo modelo FACScalibur, utilizando los programas informáticos CellQuest Pro (BD Biosciences) para la adquisición de datos y FLOWJO V10 para la cuantificación de las fases del ciclo. Se adquirieron 20000 eventos por cada condición experimental.

3.4. Ensayos ADME-T.

3.4.1 Ensayo de solubilidad cinética.

La medida de la solubilidad en medio acuoso se realizó haciendo una curva a diferentes concentraciones de compuesto para establecer la concentración de máxima solubilidad del compuesto en PBS. Ésta será la concentración que mantenga la linealidad de la señal detectada del compuesto por LC-MS/MS frente a la concentración teórica del compuesto.

En primer lugar se prepararon las siguientes diluciones de los compuestos en DMSO 0,05, 0,1, 0,5, 1 y 5 mM a partir de la solución madre de 10mM. A continuación, se añadieron 10 µl de cada dilución a 990 µl de PBS (1:100) para obtener concentraciones finales de 0,5, 1,

5, 10, 50 y 100 μM . La placa se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en agitación orbital a 300 rpm.

Como control del ensayo se usó Rapamicina (Sigma Aldrich) preparándose concentraciones de 0,5, 1, 5, 10, 50 y 100 μM en PBS en las mismas condiciones que los compuestos.

Transcurrido el tiempo de incubación las muestras se filtraron con el colector Waters a 10 mmHg durante 1 minuto. El filtrado se recogió en una placa NUNC de 96 pocillos (NUNC) y se pipetearon 50 μl de filtrado en una nueva placa Waters de 96 pocillos (Waters), añadiendo 150 μl (1:4) de acetonitrilo (Panreac Applichem) con 0,1% de ácido fórmico (Fluka) a todas las muestras. La placa se agitó a 700 rpm con agitador de placas Eppendorf (Eppendorf) y las muestras se analizaron por Cromatografía líquida acoplada a Espectrometría de Masas (LC/MS/MS, API 2000TM). Los datos se procesaron con el software Analyst 1.6.2.

Indicar que para poder hacer las determinaciones por espectrometría de masas fue necesario establecer un método específico para la detección de cada uno de los compuestos analizados.

Los compuestos se clasificaron mediante un código interno en tres grupos: baja, media y buena solubilidad respectivamente según los criterios de la Tabla 5.

Concentración de máxima solubilidad	Criterios de solubilidad
$\leq 10 \mu\text{M}$	Baja
$\leq 10 \geq 50 \mu\text{M}$	Media
$\geq 100 \mu\text{M}$	Alta

Tabla 6. Criterios de solubilidad.

3.4.2. Ensayo de difusión pasiva (PAMPA).

El ensayo de PAMPA (Permeación con Membranas Artificiales en Paralelo) es un ensayo para el estudio de la absorción pasiva y permeabilidad de fármacos, usado como modelo *in vitro* para predecir la capacidad de la molécula para atravesar la membrana celular de la mucosa gástrica o la membrana plasmática de las células diana.

Para el estudio de nuestros compuestos se usó el sistema artificial proporcionado por la casa comercial BD Biosciences. Este sistema consiste en dos placas de 96 pocillos, una placa “donadora y otra “aceptora” que se acoplan la una a la otra. En la placa donadora se sitúa el compuesto. La placa aceptora está revestida de membranas artificiales de fosfolípidos y actúa como filtro simulando el comportamiento de la membrana celular. El compuesto migra por permeabilidad pasiva, desde la placa donadora hacia la placa aceptora a través de la membrana artificial (Fig. 43).

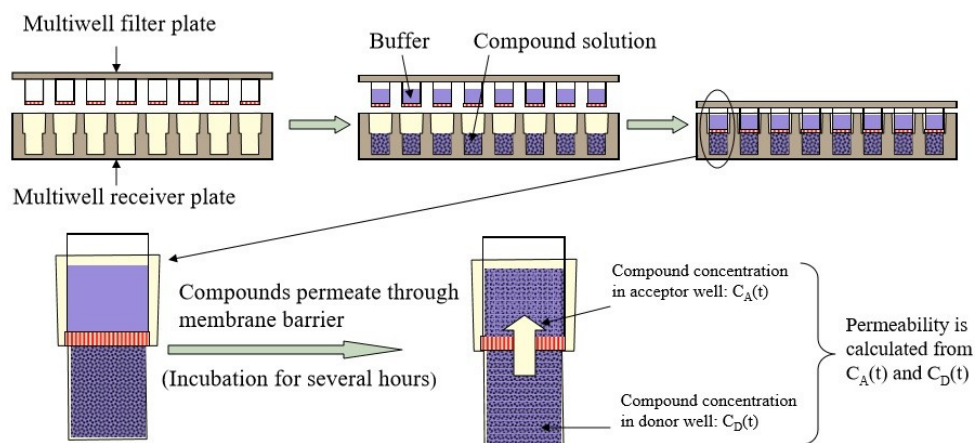


Figura 43. Fundamento del ensayo de permeabilidad PAMPA. Imagen obtenida de BD corporation.

Los compuestos se prepararon en PBS a la concentración de solubilidad más alta (cuantificada en el ensayo de solubilidad descrito en el apartado 4.4.1) de tal modo que se garantizó la solubilidad del compuesto en el medio y se minimizaron las posibles interacciones inespecíficas que pudieran afectar a la interpretación de los resultados.

El ensayo se desarrolló en dos pasos:

En primer lugar, se añadieron 100µl de compuesto a la máxima concentración soluble por duplicado en la placa donadora agitándose con movimiento orbital suave. Posteriormente se situó la placa aceptora encima de la placa donadora, a la cual previamente se habían añadido 200 µl de PBS a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 5 horas a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

En segundo lugar, para el procesamiento de las muestras, se recogió una alícuota de 100µl tanto de la placa aceptora como de la placa donadora y se transfirió a una placa de 96 pocillos de placas Waters (Waters) añadiendo a cada pocillo un volumen de 300 µl de una solución de acetonitrilo / ácido fórmico 1% (dilución 1:4).

Las muestras fueron analizadas por LC/MS/MS (API 2000™). La permeabilidad se calculó usando la Ecuación 14 [217][268]

$$P = \frac{-\ln[1 - C_A(t)/C_{equilibrio}]}{A * \left(\frac{1}{V_D} + \frac{1}{V_A}\right) * t} \quad (\text{Ec.14})$$

- CA (t) es la concentración de compuesto en el pocillo aceptor a un tiempo t
- CD (t) es la concentración de compuesto en el pocillo donador a un tiempo t
- A es el área de la membrana de filtrado (0,3cm²), t es el tiempo de ensayo en segundos
- C_{equilibrio} se calcula mediante esta fórmula $C_{equilibrio} = [CD(t) * V_D + CA(t) * V_A] / (V_D + V_A)$, siendo V_D el volumen del pocillo donador (0,3ml), V_A el volumen del pocillo aceptor 0,2ml)

Según los criterios de permeabilidad establecidos por la casa comercial los compuestos presentaron permeabilidad: alta si P era superior $1,5 * 10^{-6}$ cm/s, mientras que se consideró que tenían permeabilidad baja si P era inferior $1,5 * 10^{-6}$ cm/s.

Como controles de calidad del ensayo se usaron el propanolol con un perfil alto de permeabilidad y el Sorafenib, como un perfil de permeabilidad bajo.

3.4.3. Ensayo de estabilidad microsomal.

El ensayo de estabilidad microsomal se realizó con fracciones microsomales de retículo endoplásmico (RE) de hepatocitos. Es un modelo *in vitro* que predice la estabilidad metabólica y el comportamiento de los fármacos potenciales frente al sistema enzimático de fase I, los CYP450, enzimas que participan en los procesos de biotransformación de los xenobióticos del metabolismo hepático.

Este modelo de ensayo tiene por objetivo fundamental predecir la estabilidad del compuesto en un intervalo de tiempo (30 minutos), para asegurar una adecuada biodisponibilidad para su acción terapéutica.

El estudio de estabilidad de los compuestos se llevó a cabo en membranas microsomales de hepatocitos de tres especies diferentes (humanos, de ratón y rata, XenoTech). En estas membranas se encuentran alojadas las enzimas oxidativas, denominadas monooxigenasas de función mixta, que intervienen en las reacciones metabólicas más importantes: P450s, FMOs, NADPH-P450 reductasa entre otras enzimas oxidativas. Las P450s necesitan el cofactor NADPH para su funcionamiento como donador de electrones en la cadena de transporte electrónico, por tanto el NADPH se puede suministrar mediante la adición directa de NADPH o mediante el sistema regenerador de NADPH.

Para el estudio de la estabilidad metabólica de los compuestos se utilizó el sistema de regeneración de NADPH (REG) de la casa comercial Corning® Gentest™. Este sistema comercial aporta los componentes para la formación del cofactor NADPH, necesarios para la actividad enzimática de los CYP450, y está formado por los siguientes componentes:

- Solución A que contiene 26mM de NADP +, 66mM de glucosa-6-fosfato y 66mM de MgCl₂ en H₂O

- Solución B que contiene 40 U/ml de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en citrato de sodio 5 mM. Cuando las soluciones A y B se combinan (1:5), forman el sistema de regeneración de NADPH

El ensayo de estabilidad microsomal se desarrolló en tres pasos.

Primero, tuvo lugar la reacción enzimática y la regeneración de NADPH. Para ello, el ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 150µl en tampón fosfato 0.1M con 0.5mg/ml de membranas microsomaes de cada especie estudiada, 0.5µM de compuesto (0.5% de DMSO) y 9µl de solución A y B (1:5). El ensayo se llevó a cabo en placas NUC 96 pocillos (NUC), incubándose a 37°C, durante 30 minutos, con agitación orbital a 350 rpm. Los compuestos se testaron por duplicado con y sin sistema de regeneración como control negativo. Adicionalmente, se incluyó por una parte el Verapamil (Sigma-Aldrich), compuesto metabólicamente inestable y un compuesto estable metabólicamente, el ETP-762.

En segundo lugar, se detuvo la reacción enzimática y se separó la fase orgánica de la inorgánica, para ello se añadieron 450 µl de ACN /1% ácido fórmico, se centrifugó durante una hora a 4000 rpm a 4°C; transcurrido ese tiempo se recogió el sobrenadante (fracción inorgánica) en el que se encontraba disuelto el compuesto remanente y se procedió al análisis.

Por último, la detección y cuantificación de los compuestos se llevó a cabo por LC-MS/MS tanto en las muestras con REG (con reactivo de regeneración del NADPH) y sin REG. Se calculó el porcentaje del mismo existente en relación al 100% de compuesto control, no metabolizado aplicando la Ecuación 15.

$$\% \text{ de compuesto remanente} = \frac{\text{Área del pico con REG}}{\text{Área del pico sin REG}} \times 100 \text{ (Ec.15.)}$$

Se testaron 6 compuestos por placa, en placas de 96 pocillos siguiendo el diseño de la Fig. 44, donde iban incluidos tanto el compuesto control estable como el inestable. Los diferentes reactivos fueron dispensados con el equipo multidispensador *Biomek FX* (*Beckman*).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		MSratón	MSratón	MSratón	MSratón	MShumano	MShumano	MShumano	MShumano	MSrata	MSrata	MSrata	MSrata
A	Compuesto 1	sin REG	sin REG	con REG	con REG	sin REG	sin REG	con REG	con REG	sin REG	sin REG	con REG	con REG
B	Compuesto 2	sin REG	sin REG	con REG	con REG	sin REG	sin REG	con REG	con REG	sin REG	sin REG	con REG	con REG
C	Compuesto 3	sin REG	sin REG	con REG	con REG	sin REG	sin REG	con REG	con REG	sin REG	sin REG	con REG	con REG
D	Compuesto 4	sin REG	sin REG	con REG	con REG	sin REG	sin REG	con REG	con REG	sin REG	sin REG	con REG	con REG
E	Compuesto 5	sin REG	sin REG	con REG	con REG	sin REG	sin REG	con REG	con REG	sin REG	sin REG	con REG	con REG
F	Compuesto 6	sin REG	sin REG	con REG	con REG	sin REG	sin REG	con REG	con REG	sin REG	sin REG	con REG	con REG
G	Verapamil	sin REG	sin REG	con REG	con REG	sin REG	sin REG	con REG	con REG	sin REG	sin REG	con REG	con REG
H	ETP-762	sin REG	sin REG	con REG	con REG	sin REG	sin REG	con REG	con REG	sin REG	sin REG	con REG	con REG

Figura 44. Diseño de la placa para el ensayo de estabilidad microsomal en microsomas humanos, de ratón y de rata.

3.4.4 Ensayo de citocromos P450.

Está descrito que muchos fármacos afectan a las enzimas del sistema P450 de forma competitiva, debido a que los sustratos de dichas enzimas no son específicos. Por ello es necesario disponer de un modelo predictivo para evaluar la actividad de los compuestos candidatos sobre la modulación (inhibición o inducción) de dicho sistema.

En nuestro estudio incluimos cinco isoformas del citocromo CYP450, las de mayor implicación y participación en los procesos de biotransformación de xenobióticos (CYP1A2; CYP2C19; CYP2C9; CYP2D6; CYP3A4).

Evaluamos la posible inhibición de P450 mediante el ensayo P450-Glo (Promega). Este es un ensayo bioquímico acoplado al sistema luciferin/luciferasa que emite bioluminiscencia.

Los sustratos son proluciferinas, derivados de la luciferina del escarabajo [(4S)-4,5-dihidro-2-(6'-hidroxi-2'-benzotiazolil)-4-tiazol ácido carboxílico], que son convertidos por los citocromos en d-luciferina la cual será detectada en una segunda reacción acoplada al sistema de detección luciferina/luciferasa, produciendo luz cuantificada como unidades relativas de luz (RLU).

La cantidad de luz emitida es directamente proporcional a la actividad del citocromo P450.

Si la enzima P450 está inhibida (por el compuesto), se observaría un decrecimiento de la señal de luminiscencia.

El ensayo enzimático de CYPs se desarrolló en dos pasos:

En primer lugar, se llevó a cabo la reacción enzimática en un volumen final de 25µl, en tampón K3PO4 pH7.4 ó Tris-HCl pH7.5, según el CYP.(ver Tabla 6).

Inicialmente, se mezcló la enzima y el sustrato en tampón, volumen final 11µl (Tabla 6); a continuación se añadieron 1.5 µl del compuesto, a una concentración de 10µM al 0.5% de DMSO en diluciones seriadas 1/3 o punto simple a 5µM.

La mezcla se homogeneizó en la centrífuga durante 1 minuto a 1000rpm, y se preincubó durante 5 minutos. Posteriormente se inició la reacción añadiendo 12.5µl de reactivo de regeneración de NADPH (co-sustrato, proporcionado por el kit). El ensayo se realizó en placas Optiplate 384 (PerkinElmer) incubándose a 37°C, durante 60 minutos. Como controles del ensayo cada isoforma se testó con un inhibidor de referencia (Tabla 7). Los diferentes reactivos fueron dispensados con el robot *Biomek FX*.(*Beckman*.

Enzima CYP450	CYP1A2	CYP3A4	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6
Concentración (picomol/ μ l)	0,01	0,01	0,01	0,005	0,005
Sustrato Luciferin	luciferin-ME	Luciferin-PPXE	Luciferin-H	Luciferin-H-EG	Luciferin-ME-EG
Concentración (μ M)	100	56,5	100	10	30
Tampón de ensayo					
KPO ₄ 1 M, pH 7.4 (μ M)	100		25	50	100
Tris-HCl 2 M, pH 7.5 (μ M)		100			

Tabla 7. Concentraciones de sustrato, CYP450 y tampón usados en el ensayo.

En un segundo paso tuvo lugar la reacción de detección de la señal bioluminiscente.

La reacción se inició añadiendo 25 μ l de reactivo LDR ó LDR+E (proporcionado por el kit, con esterasa para el CYP3A4, sin esterasa para los demás citocromos, se incubó a 37°C durante 30 minutos protegido de la luz. Posteriormente se procedió a la lectura de la placa en lector EnVisión, excitando la muestra a una longitud de onda de 340nm, dando lugar a la emisión de una señal luminiscente que era proporcional a la actividad de los P450s.

	Inhibidores de referencia
CYP1A2	Furafylline (FFY)
CYP3A4	Ketoconazole (KTZ)
CYP2C9	Sulfaphenazole (SPH)
CYP2C19	N-3-Benzylirivanol (N3B)
CYP2D6	Quinidine (QDN)

Tabla 8. Relación de los inhibidores de referencia usados en el ensayo

El formato de placa fue el formato genérico diseñado para su procesamiento en pipeline/ Activity Base, previamente descrito en el apartado 4.2.4. Para cada P450 se utilizó un inhibidor de referencia (Tabla 8). Para cuantificar la modulación de los inhibidores frente a las diferentes isoformas, se aplicaron las ecuaciones genéricas descritas previamente para la determinación de la IC₅₀ y de inhibición a punto simple (Apartado 3.2.5).

3.4.5. Ensayo de canales de K⁺: hERG.

El ensayo para identificar inhibidores de canales de K⁺ hERG, se basa en los principios de la fluorescencia polarizada (FP). Los fluorófos absorben luz en una dirección específica en relación con el eje molecular, la rapidez con que un fluorófos rota durante el estado excitado determina su polarización o anisotropía. Cuando las molécula pequeñas con propiedades fluorescente (fluorófos) se excitan con luz plana polarizada, la luz emitida se despolariza en niveles altos (la tasa de rotación en plano es alto) y la señal fluorescente disminuye rápidamente, sin embargo si el fluoróforo se une a una molécula de gran tamaño como las proteínas o macromoléculas, su tasa de rotación sobre el plano decrece y la anisotropía aumenta, produciendo niveles de fluorescencia polarizada alta [269].

El ensayo Predictor hERG de fluorescencia polarizada (FP) de Invitrogen está diseñado para medir moléculas competidoras que se unen con afinidad a la proteína de canal de potasio hERG, y por tanto permite la identificación de potenciales bloqueadores de dichos canales, presentes en la membrana plasmática de las células del músculo cardíaco. El trazador Tracer Red presenta elevada afinidad por las proteínas hERG (al ser excitado a 540nm emite a 573nm). Si el trazador está unido a una molécula grande, como son las proteínas hERG, la rotación sobre el plano es baja y emite luz altamente polarizada (señal alta de milipolarizació, mP). Si el trazador es desplazado por un compuesto inhibidor que presenta afinidad por la proteína la señal de luz polarizada será mucho menor (baja emisión de mP). De esta forma, podemos discriminar los compuestos que tienen afinidad sobre canales de K⁺ hERG y descartarlos (Fig. 45).

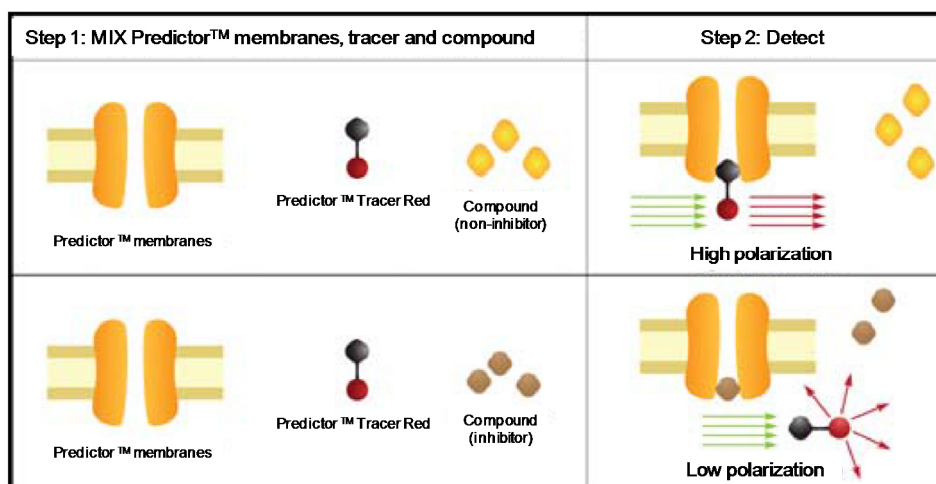


Figura 45. Fundamento del ensayo hERG:

Los inhibidores desplazan al trazador del canal hERG produciendo mayor rotación de las moléculas y disminuyendo por tanto los niveles de fluorescencia polarizada. Imagen obtenida de Invitrogen/ThermoFisher Scientific.

Este es un ensayo homogéneo que se realizó en un solo paso. El ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l conteniendo 5 μ l de compuesto a una concentración 4x (125 μ M al 4% de DMSO) en solución de tampón de ensayo (25mM HEPES pH7.5, 15mM KCl, 1mM MgCl₂, y 0,05% Pluronic F-127), 10 μ l de membranas donde se localiza la proteína hERG a una concentración 2x (de membranas) y 5 μ l trazador en tampón de ensayo a una concentración 4x (4nM) [231].

La mezcla se homogeneizó y centrifugó durante 30'' a 1000 rpm. El ensayo se realizó en placas de 384 (Corning) y se incubó durante 4 horas a temperatura ambiente protegido de la luz.

Los diferentes reactivos fueron dispensados en Biomek FX en el siguiente orden: compuesto, membranas y trazador. Transcurrido el tiempo de incubación se centrifugó la placa durante 30'' a 1000 rpm y se midió en el lector de placas EnVision (Perkin Elmer) utilizando filtros polarizados, cuyas longitudes de onda de excitación y de emisión fueron respectivamente de 530 nm y a 585 nm.

En el ensayo se incluyeron 3 tipos diferentes de controles.

- El control positivo del ensayo que representa el 100% de desplazamiento del trazador (baja señal de mP) que contenía todos los componentes del ensayo y el inhibidor de referencia de E-4031 con alta afinidad por la proteína del canal hERG.
- El control negativo que contenía los mismos componentes que el control positivo pero sin inhibidor E-4030, representa el 0% de desplazamiento (máxima señal de mP).
- Y por último, el control de fondo del ensayo o blanco, usado para normalizar la señal y que no lleva trazador ni membranas, solamente tampón de ensayo y el porcentaje de DMSO del ensayo.

En la Fig. 46 se describe el formato de la placa de ensayo de 384 pocillos, donde se representa la distribución de los diferentes controles del ensayo: el área verde corresponde a los controles positivos, el área roja corresponde a los controles negativos, el área azul oscuro al fondo del ensayo, el área amarilla al control del inhibidor de referencia E-4030, y el área central naranja, corresponde a las muestras o compuestos a testar, (16 compuestos por placa 9 diluciones seriadas por duplicados).

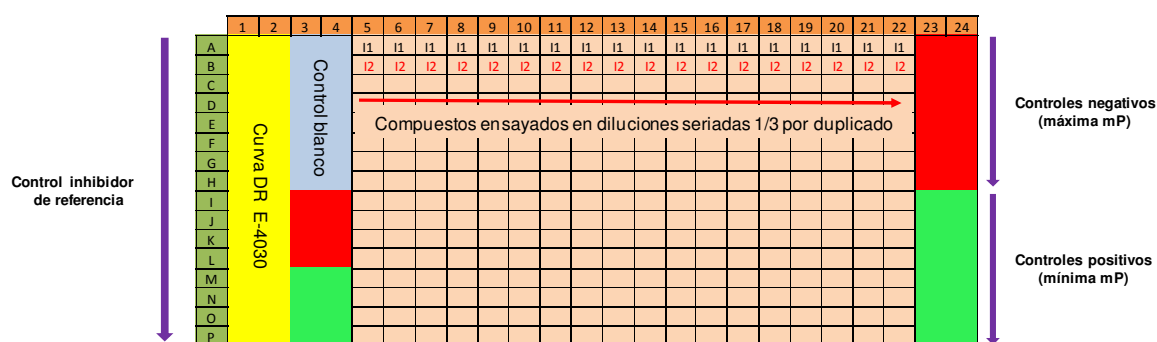


Figura 46. Formato placa del ensayo hERG.

Para calcular el nivel de anisotropía de fluorescencia (r) o polarización de las muestras, se aplicó la Ecuación 17 derivada de la Ecuación de Jablonski [269] donde I_{\parallel} e I_{\perp} son las

componentes de la emisión de fluorescencia en las direcciones paralela y perpendicular respectivamente a la dirección del plano de polarización de excitación. Esta Ecuación asume que la luz se transmite igualmente bien a través de polarizadores orientados paralelamente y perpendicularmente. En la práctica, esto generalmente no es cierto y debe realizarse una corrección para medir el estado de polarización absoluta de la molécula. Este factor de corrección se llama factor G (gain). El factor G depende del instrumento y puede variar ligeramente. El factor G aplicado según nuestro lector de placas EnVisión es de 1,03. La Ecuación 16 se aplicó a todas las muestra de la placa para calcular las unidades de mP normalizadas para cada muestra (descontando el fondo del ensayo), multiplicado por 1000. A partir de la transformación de la señal obtenida en mP posteriormente fueron calculados los valores de la señal máxima y la señal mínima y a partir de estos valores se aplicó la Ecuación 17 para calcular el porcentaje de inhibición de cada muestra. Posteriormente para la determinación del valor de IC₅₀ se aplicó el modelo 205 de 4 parámetros logísticos que proporciona el software de Activity Base descrito en el apartado 4.1.5.1.

$$mP = 1000 * \left(\frac{I_{\parallel} - (blanco) - G I_{\perp} - (blanco)}{I_{\parallel} - (blanco) + G * 2 I_{\parallel} - (blanco)} \right) \quad (Ec.16)$$

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \left(\left(\frac{mP \text{ inhibidor} - mP \text{ control negativo}}{mP \text{ control positivo} - mP \text{ control negativo}} \right) \times 100 \right) \quad (Ec.17)$$

3.5. Estudios de farmacocinética.

Se llevaron a cabo estudios farmacocinéticos para estudiar qué sucede con los compuestos al administrarlos en el organismo vivo. Los parámetros farmacocinéticos describen la absorción, distribución, metabolismo y excreción del compuesto en un organismo vivo. Los resultados del estudio de farmacocinética proporcionan información para seleccionar las moléculas más avanzadas y para decidir la dosis efectiva para futuros estudios [270]. Los datos

de PK nos permiten seleccionar las dosis y los tiempos de administración apropiados para los estudios de PK/PD y eficacia en modelos animales [208].

Se utilizaron ratones hembra Balb/C inmunocompetentes de 8 semanas (Harlan) en los experimentos in vivo de estudios farmacocinéticos.

Antes del experimento, los ratones fueron marcados y ponderados para calcular la dosis. Las inyecciones intravenosas se llevaron a cabo inyectando la solución del compuesto en la vena de la cola. La sangre se recogió mediante punción cardíaca a los tiempos de 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1 h, 4h y 8 h con jeringa heparinizada (Hospira). Las administraciones orales se llevaron a cabo administrando la dosis mediante sonda gástrica. Las muestras de sangre se recogieron a los tiempos de 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 4 horas, 8 horas y 24 horas.

Antes de la punción cardíaca, los ratones se transfirieron a una cámara de inducción y se anestesiaron con 100% p/p de isoflurano (IsoFlo, Esteve). Se mantuvo la anestesia con isoflurano a través de máscara y se realizó la punción cardíaca.

Las muestras de sangre se recogieron en tubos Eppendorf. Los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm con una centrífuga Eppendorf 5415D. El plasma se recogió en tubos eppendorf nuevos y los tubos se centrifugaron una vez más con las mismas condiciones para asegurarse de que se extrajeron todos los glóbulos rojos. El plasma se recogió en tubos nuevos para el análisis de las muestras.

Para calcular las concentraciones de compuesto en el plasma, se preparó una curva estándar. Primero, se pipetearon 45 μ l de plasma de ratones Balb/C no tratados (Innovative research) en pocillos de la placa de 96 pocillos con fosfolípidos HybridSPE (Supelco) y 5 μ l de solución de compuesto (0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 5,0, 10, 50 o 100 μ g / ml) se añadieron a los pocillos

de modo que las concentraciones finales del compuesto en los mismos fueran de 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000 o 10000 ng / ml.

A continuación, se pipetearon 50 μ l de cada muestra de plasma recogida en la placa de 96 pocillos HybridSPE-phospholipid. Se añadieron 150 μ l de acetonitrilo frío con 0,1% de ácido fórmico con el estándar interno SB431542 (Sigma - Aldrich) (100 ng/ml) a los pocillos con el fin de precipitar las proteínas.

Las muestras se filtraron con 10 mmHg a través de la placa de 96 pocillos HybridSPE-phospholipid usando Vacuum Manifold (Waters). Para eliminar los fosfolípidos de las muestras ya que la contaminación con fosfolípidos causa la supresión iónica para el análisis LC-MS/MS.

La concentración de compuesto en plasma a diferentes tiempos se usó para obtener los parámetros farmacocinéticos (Tabla 9). Estos se obtuvieron por análisis con el software Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight). Para obtener los parámetros, tanto la concentración del fármaco en el plasma en cada punto de tiempo, como los puntos de tiempo utilizados y la concentración de la dosis administrada o inyectada se introdujeron en el software.

Parámetros farmacocinéticos		
Biodisponibilidad	F(%)	Fracción del compuesto administrado que alcanza la circulación sistémica
Concentración máxima en plasma	C _{max} (ng/ml)	Concentración máxima en plasma después de la administración
Tiempo al que se alcanza la C_{max}	T _{max} (h)	Tiempo al que se alcanza la concentración máxima en plasma
Área bajo la curva	AUC inf (h·ng/ml)	Área bajo la curva de la concentración de compuesto en el plasma frente al tiempo; una medida de la exposición del cuerpo al compuesto
Vida media	T _{1/2} (h)	El tiempo que tarda el compuesto en disminuir a la mitad de su cantidad original en la circulación sistémica
Aclaramiento	Cl (l/h/kg)	Volumen de sangre que contiene el compuesto eliminado por unidad de tiempo
Volumen de distribución	V _d (l/kg)	Volumen teórico que se necesitaría para contener la concentración total de compuesto que está presente en el plasma
Tiempo medio de residencia	MRT (h)	El tiempo promedio que las moléculas permanecen en el cuerpo

Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos.

La biodisponibilidad se calculó utilizando la Ecuación 18.

$$Biodisponibilidad(\%) = \frac{AUC_{oral} \cdot Dosis_{iv}}{AUC_{iv} \cdot Dosis_{oral}} \cdot 100 \quad (Ec.18)$$

Donde:

- AUC_{oral} es el área bajo la curva para la administración oral.
- $Dosis_{iv}$ es la dosis administrada intravenosa.
- AUC_{iv} es el área debajo de la curva para la inyección intravenosa
- $Dosis_{oral}$ es la dosis administrada oralmente.

4. Resultados

4.1. Desarrollo y validación del ensayo de unión para la identificación de inhibidores de CDK8/CycC.

4.1.1. Determinación de la concentración de enzima.

Para la identificación de compuestos activos frente a la diana CDK8 / CycC optamos por un ensayo de unión con tecnología TR-FRET usado como referencia para la identificación de inhibidores de CDKs procedentes de pequeñas moléculas [234].

Tal y como se ha descrito detalladamente en el apartado 5.1.1 de M&M, el fundamento técnico de la tecnología se basa en la transferencia de energía entre un trazador con alta afinidad que mimetiza la estructura del ATP y un anticuerpo conjugado que reconoce el “Tag” unido a la proteína.

En esta primera etapa determinamos los parámetros bioquímicos del ensayo: i) constante de disociación en equilibrio (K_d) del trazador 236 Alexa fluor, lo que nos permitirá seleccionar la concentración del trazador en el ensayo, ii) la concentración de enzima óptima, CDK8 / CcyC a partir de ahora de forma abreviada nos referimos al complejo como CDK8, iii) la concentración de anticuerpo anti-Tag de histidina.

Para establecer la concentración óptima de enzima en el ensayo, se realizó una curva de progresión a diferentes concentraciones, haciendo diluciones seriadas a partir de una concentración de 4µg/ml y en las condiciones de trazador 236 y anticuerpo propuestas por la casa comercial (ver descripción en M&M).

La Fig. 47A representa la curva de progresión de la unión de CDK8-trazador durante 60 minutos a temperatura ambiente (TA), como se observa la curva describió un incremento progresivo de la señal, que correspondía a la interacción del complejo enzima-trazador, hasta alcanzar la señal máxima de unión, correspondiente a la máxima concentración de enzima (4 μ g/ml) en el ensayo.

La Fig. 47B representa la región lineal de la curva de titulación de la enzima, donde se observó un rango de linealidad amplio por debajo de la concentración de 1 μ g/ml, lo cual nos permitió determinar la concentración óptima de enzima en condiciones de velocidad inicial y próximas al inicio de la reacción de unión, para asegurarnos que teníamos más del 90% de sustrato libre (vi). La elección de la concentración óptima de enzima debe de estar en equilibrio con la ventana de ensayo (relación señal/ fondo) y el nivel de detección asociado a la sensibilidad del equipo de medida (lector Envision) y la tecnología empleada. La concentración de enzima seleccionada fue de 0.1 μ g/ml.

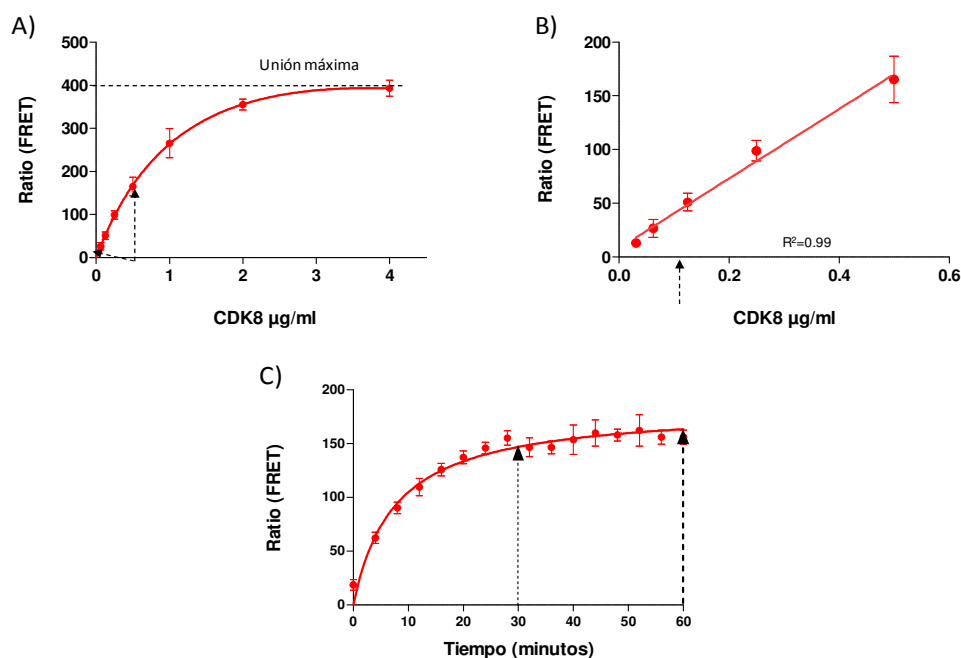


Figura 47. Establecimiento de las condiciones óptimas de la concentración de enzima y tiempo del ensayo. A). Curva de progreso de la actividad de CDK8 / CycC. B). Rango de la zona lineal de la reacción de unión que garantiza condiciones de velocidad inicial y estabilidad (menos del 10% de trazador unido en el inicio de la reacción). C). Ensayo de unión en función del tiempo a la concentración seleccionada (0.1 μ g/ml).

La Fig. 47C corresponde a un ensayo de unión en función del tiempo a la concentración de enzima seleccionada, según los resultados del experimento anterior. El ensayo se realizó incubando la enzima, el trazador y el anticuerpo a diferentes tiempos para determinar el tiempo de ensayo más adecuado, en equilibrio con la relación señal/ fondo. Según la gráfica se observó que en el intervalo de tiempo de 30-60 minutos obteníamos la máxima señal de unión del complejo CDK8-trazador, por razones logísticas se estableció el tiempo del ensayo en 1 hora.

4.1.2. Estimación de la constante de disociación del trazador (K_d).

Para determinar la constante de disociación del trazador (K_d) se realizaron dos experimentos. En primer lugar, se realizó una curva de progresión a diferentes concentraciones, haciendo diluciones seriadas a partir de una concentración de 130nM , utilizando la concentración de enzima optimizada de 0.1µg/ml y de Eu-anti his Tag de 1.5nM (concentración de partida). Aplicando la Ecuación 8 del apartado de M&M se obtuvo una K_d de 7.2+/- 0.3 nM. (Figura 48 A).

En un segundo experimento, se estudió la unión del trazador a CDK8 en el curso del tiempo a diferentes concentraciones al objeto de estudiar la cinética de asociación del complejo enzima-trazador, la proporcionalidad de la respuesta de ocupación en función de la concentración del trazador y el tiempo de saturación, tiempo en el que se alcanza la máxima señal (máximo nivel de unión que representa el equilibrio específico para cada concentración). El experimento diseñado responde a un modelo temporal de asociación de ligando y receptor a diferentes concentraciones de ligando, donde las diferentes curvas representan el curso del equilibrio de asociación entre el ligando y receptor en función de la concentración de ligando usada en el ensayo.[271]

De la Figura 48B se desprende que a concentraciones de trazador menores que su K_d tenía lugar el equilibrio cuando la unión proteína-trazador estaba por debajo del 50% del nivel

de ocupación enzima-trazador (por limitación del trazador). A concentración de trazador próxima a su K_d , la velocidad de asociación era mayor, ocupándose el 50% de las interacciones posibles proteína-trazador y finalmente si la cinética de asociación se iniciaba con una concentración de ligando mucho más alta que su valor K_d la velocidad de asociación es máxima y la proteína se satura produciéndose el 100% de las interacciones posibles. Se eligió una concentración de trazador de 10nM próxima al valor de la K_d , no saturante y en equilibrio con la concentración de enzima establecida como concentración óptima y la ventana del ensayo (señal/ruido).

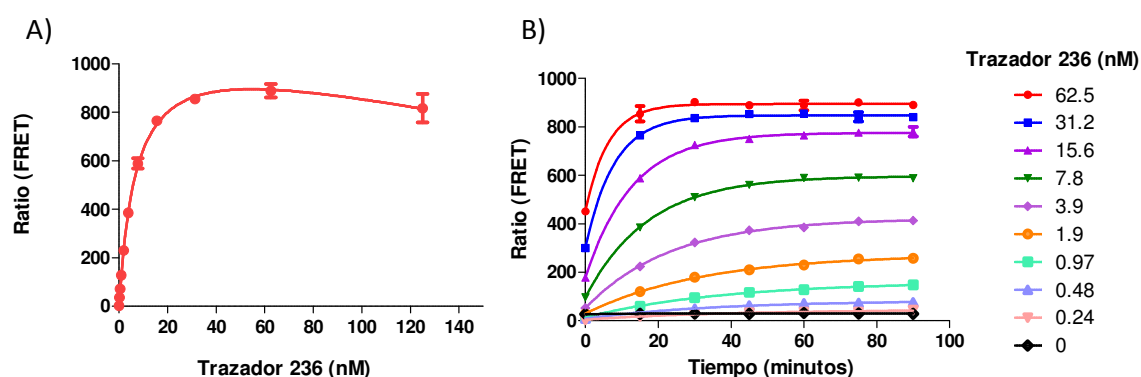


Figura 48. Determinación de la K_d del trazador 236 y ensayo de unión en función del tiempo a diferentes concentraciones de trazador.

A) Curva de saturación del trazador para la determinación de la constante de disociación K_d . B). Representación del curso de asociación enzima y ligando (CDK8-trazador) a diferentes concentraciones de trazador.

4.1.3. Determinación de la concentración óptima de Eu-anti-His-Tag.

Para establecer la concentración óptima del anticuerpo anti-His marcado con Europio, Eu-anti-His, se realizó una curva de saturación a diferentes tiempos y diferentes concentraciones de anticuerpo, haciendo diluciones seriadas a una concentración de enzima de 0.1 μ g/ml y 10nM de trazador establecidas previamente.

Como se puede observar en la Fig. 49A las intensidades más altas de TR-FRET se obtuvieron a concentraciones más bajas del anticuerpo. Así mismo, la relación señal ruido no

guardó una relación directamente proporcional a la concentración de anticuerpo empleada (Figura 49B). Así, a concentraciones elevadas de anticuerpo, la enzima estaba saturada, en esta situación obtuvimos un valor de ventana (S/B) más bajo. Por otra parte se incrementó la ventana a concentraciones de anticuerpo menores (entre 5 y 1.25nM) que resultó ser la concentración de anticuerpo óptima desplazándose el equilibrio hacia la formación del conjugado enzima-anticuerpo. En el otro extremo del gráfico, se observó una bajada de la ventana que estaba directamente en relación con la concentraciones mas bajas de anticuerpo (en esta situación , el factor limitante era la concentración insuficiente de anticuerpo para conjugarse con toda la enzima libre).

La relación de equilibrio que se describe en la gráfica, en forma de campana, es similar al denominado efecto “*Hook*”. El "efecto gancho" es un fenómeno común en los sistemas de detección biomoleculares que implican reactivos saturables (anticuerpos marcados, estreptavidina, etc.). Por ello, se observa en ensayos TR-FRET donde la relación estequiométrica esta descompensada. Estas curvas a menudo tienen forma de campana y se caracterizan por una disminución de la señal después de una zona de meseta (señal óptima) y de una disminución de la señal dependiente de la concentración más baja de anticuerpo.

Se obtuvo el mismo valor de ventana prácticamente entre 5 y 1.25 nM. Por tanto, establecimos una concentración standard de Eu-Anti-his Tag de 1.5nM y por cuestiones logísticas un tiempo de 60 minutos.

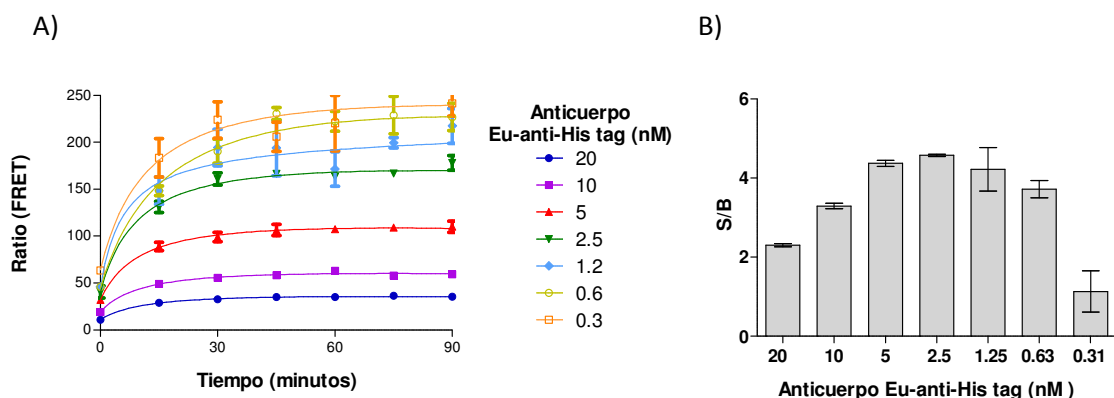


Figura 49. Titulación del anticuerpo Eu-Anti-His.

A) Curva de saturación de Eu-Anti-His a diferentes tiempos. B). Progresión de la ventana del ensayo a 60 minutos en función de la concentración de anticuerpo Eu-Anti-His.

Los parámetros estudiados asociados a las condiciones bioquímicas del ensayo, con la tecnología empleada, nos permitieron establecer las condiciones finales de ensayo (Tabla 10).

Condiciones Bioquímicas de Ensayo	
CDK8 (µg/ml)	0,10
Trazador 236 (nM)	10
Anticuerpo Eu-Anti-His (nM)	1,50
Tiempo de incubación (minutos)	60
Temperatura (°C)	TA

Tabla 10. Condiciones bioquímicas del ensayo.

4.1.4. Estudio de los parámetros estadísticos que establecen la calidad de un ensayo de HTS.

El ensayo establecido debía diseñarse con el objetivo final de lograr discriminar con precisión un *Hit* o compuesto activo de un compuesto no activo, *NO-Hit*, frente a nuestra diana. Por tanto, la precisión y calidad era necesaria para obtener unos niveles elevados de fiabilidad de los resultados. Ya que, en la fase de cribado primario, los compuestos de la librería se testarían a punto simple y era necesario minimizar el número de posibles compuestos falsos positivos y falsos negativos.

Para evaluar la calidad del ensayo y robustez se llevó a cabo un análisis estadístico de poblaciones de datos obtenidos en las condiciones finales del ensayo.

Se analizaron los siguientes parámetros (Fig. 50):

1.- La media aritmética de los controles positivos (con enzima, C+) y controles negativos (sin enzima, C-) en el ensayo, donde se añaden respectivamente todos los componentes de la reacción menos el enzima en los controles negativos.

2.- La desviación standard de las dos poblaciones de controles (σ_{c+} y σ_{c-}).

3.- La ventana del ensayo o relación señal/fondo o “background” (S/B de *signal/background* en inglés), entendiendo ésta como la diferencia del valor nominal, del control positivo (C+), como el 100% la actividad biológica de la enzima y el control negativo (C-) como el 0% de actividad biológica (sin enzima)

4.- El coeficiente de variabilidad o dispersión del ensayo (% CV), representa la variabilidad del ensayo dentro de la misma placa de las dos poblaciones de controles.

5.- Estimación del factor Z' : parámetro estadístico que relaciona la S/B del ensayo y la desviación estándar (σ) de las dos poblaciones de controles positivos y controles negativos. Con este parámetro se determina la variabilidad y robustez del ensayo.

Como criterio se consideró un buen valor de Z' si era ≥ 0.5 siendo el valor 1 el máximo valor posible (explicado detalladamente el apartado 3.1.4 de M&M).

A) $\mu = \Sigma x/n$

B) $S/B = \frac{\text{mean signal}}{\text{mean background}}$

C) $Z = 1 - \frac{3SD \text{ of sample} + 3SD \text{ of control}}{|\text{mean of sample} - \text{mean of control}|}$

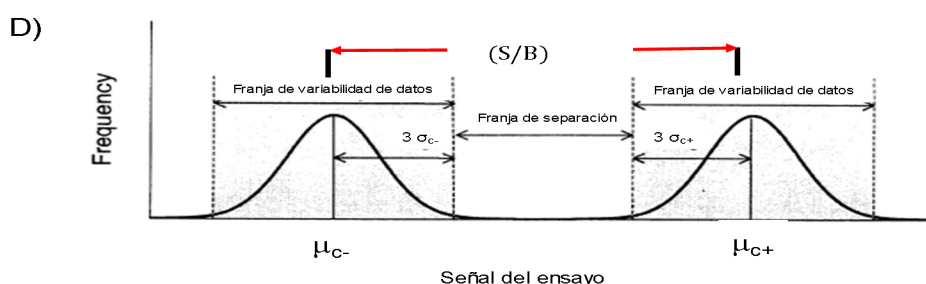


Figura 50. Parámetros estadísticos que determinan la calidad y robustez del ensayo.

A) Estadístico de la media aritmética. B) Ventana del ensayo. C) factor z' . D) Representación gráfica del concepto de Ventana de un ensayo. Zhang y col. 2013 [258]

El objetivo era obtener una amplia ventana absoluta y una baja variabilidad entre los pocillos de cada control, para obtener una amplia separación entre las poblaciones de los dos tipos de controles lo que indicaba una buena calidad y fiabilidad en la discriminación de compuestos activos.

Como se puede ver en la Fig. 51 el ensayo establecido resultó ser robusto y fiable, pues al realizar el ensayo en dos días diferentes los parámetros estadísticos fueron muy similares.

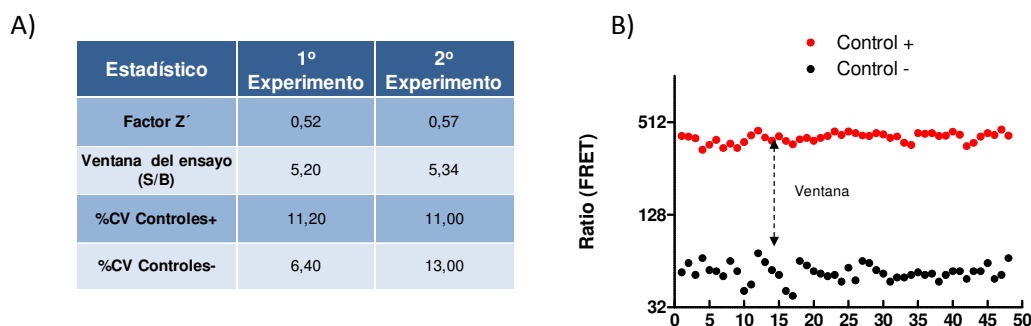


Figura 51. Resultados obtenidos relativos a los controles de calidad en la puesta a punto del ensayo.

A) Resultados de los parámetros de calidad obtenidos en dos experimentos. B) Representación mediante gráfico de la dispersión de puntos de las dos poblaciones de controles Control positivo con enzima y Control negativo sin enzima (ventana del ensayo).

Basados en estos resultados, se establecieron los siguientes criterios para la validación de cualquier ensayo en todo el proceso de identificación de compuestos activos: ventana del ensayo ≥ 2.5 , el factor $Z' \geq 0.5$ y $\%CV \leq 15$.

4.1.5. Estudio de la estabilidad de CDK8 / CycC, tolerancia al DMSO y miniaturización del ensayo.

En las condiciones establecidas de los componentes de reacción del ensayo se llevaron a cabo experimentos para establecer: i) la estabilidad de la enzima, ii) la influencia del DMSO, como solvente usado en la preparación de los compuestos y iii) la robustez del ensayo en placas de 384 pocillos optimizadas, usadas en HTS.

Los resultados relativos a la estabilidad de la enzima, la influencia del DMSO y la elección del tipo de placa eran necesarios para miniaturizar el ensayo, optimizar el consumo de los reactivos y garantizar condiciones de estabilidad durante la campaña de cribado.

Los dos formatos de placas de 96 y 384 pocillos mantuvieron los criterios de calidad, con un factor Z' entre 0,6 y 0,7 (1 es el factor Z' máximo) (Fig 52A). Este proceso implicó una

miniaturización del ensayo cuyos objetivos iban orientados, fundamentalmente, a minimizar los costes; por ejemplo, reduciendo al máximo posible el volumen de reactivos, así como, a incrementar el rendimiento, optimizando el número de compuestos ensayados por día en las campañas de cribado en la fase de *HTS*.

CDK8 / CycC resultó ser estable frente a los diferentes ciclos de congelación-descongelación (Fig. 52B). Se consideraron cero descongelaciones, a la utilización por primera vez de la enzima desde su conservación a -80°C. La pérdida del 10% de actividad que se observó con 4 y 6 ciclos de descongelación (90% activa), aunque no fue significativa, se tuvo en cuenta para su almacenamiento. Por otra parte, los datos mostrados de la estabilidad a TA, indicaron que perdía un 60% de actividad, por tanto la enzima era muy inestable a TA y a 4°C, mostrando un pérdida de actividad significativa del 20%.

El estudio de tolerancia al DMSO, disolvente usado en la preparación de los compuestos, se realizó en dosis respuesta y por duplicado (Fig. 52C). Se observó que al 2% de DMSO se perdía entorno al 20% de actividad, luego los resultados indicaron que debíamos usar concentraciones por debajo del 1% de DMSO para minimizar el efecto sobre la actividad de CDK8 / CycC. Este dato se tuvo en cuenta a la hora de disolver los compuestos para testarlos en el ensayo.

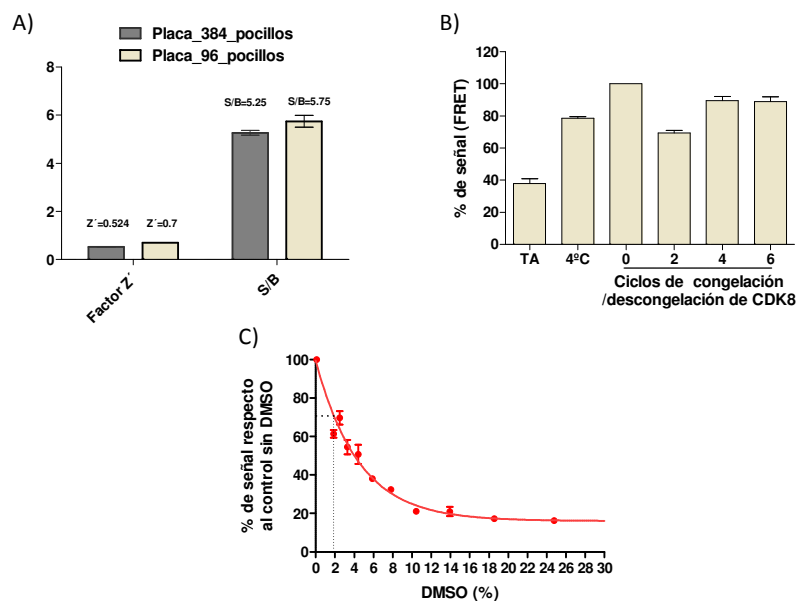


Figura 52. Miniaturización del ensayo, estabilidad de la enzima y tolerancia al DMSO.

A) Adaptación del ensayo de placa de 96 pocillos a 384 para la adaptación del diseño de ensayo a la plataforma robotizada. B) Estudio de la estabilidad de la enzima en los diferentes ciclos de congelación/descongelación. C) Estudio de la tolerancia al DMSO, como solvente usado en la preparación de los compuestos.

En la Tabla 11 se recogen las condiciones de ensayo finales.

Condiciones finales de ensayo	
CDK8 (µg/ml)	0,125
Trazador 236 (nM)	10
Anticuerpo Eu-Anti-His (nM)	1,50
Tiempo de incubación (minutos)	60
Temperatura (°C)	TA
% DMSO	≤1
Placa de ensayo	384 pocillos
Dispensación (plataforma robotizada)	Biomek FX

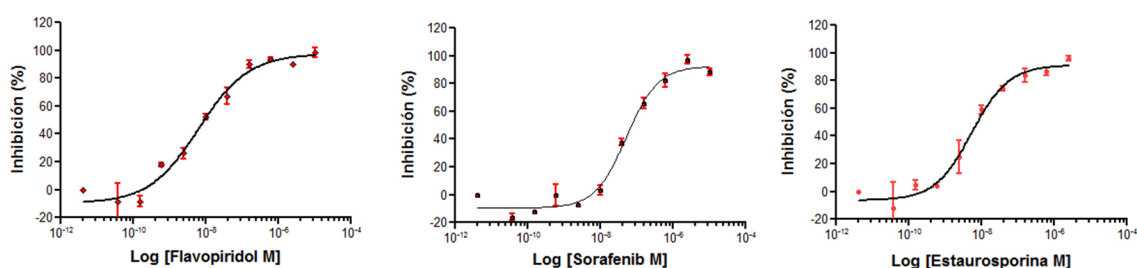
Tabla 11. Condiciones finales de ensayo

4.1.6. Validación del ensayo con inhibidores de referencia de CDK8.

El conocimiento de la diana nos permite la selección de un grupo concreto de compuestos referenciados en la literatura donde los valores calculados de IC₅₀ validarán las condiciones de ensayo elegidas. En nuestro caso escogimos el sorafenib, flavopiridol y estaurosporina como inhibidores reportados de CDK8, aunque no selectivos.

En las condiciones elegidas, se llevó a cabo un experimento de dosis respuesta para calcular el valor de la IC₅₀ del set de inhibidores seleccionados (tal y como se describe en el apartado 3.1.5 de M&M).

El experimento se llevó a cabo empezando a una concentración de 10 μM, y haciendo diluciones seriadas al 1/3 de los compuestos disueltos en DMSO al 1% concentración final en el ensayo. Los resultados obtenidos tuvieron consistencia con los valores de referencia publicados en la literatura (Fig. 53) [95].



Compuestos de referencia	IC ₅₀ (nM)	
	Dato interno	Referencia
Sorafenib	50,95 ± 1,48	130*
Flavopiridol	5,58 ± 0,95	16*
Estaurosporina	4,94 ± 0,49	NA

Figura 53. Curvas de dosis respuesta de los inhibidores de referencia usados en la validación del ensayo. Comparativa de las IC₅₀ obtenidas con las descritas en la literatura. *

4.2. Identificación y generación de compuestos activos.

4.2.1. Cribado de librerías para la identificación y validación de compuestos activos.

Con el fin de identificar inhibidores de CDK8 se realizó un escrutinio de 2629 compuestos procedentes de dos librerías de orígenes diferentes con el ensayo de unión descrito en el apartado 5.1.

Por un lado se realizó un escrutinio de 1088 compuestos seleccionados mediante técnicas de escrutinio virtual por acoplamiento molecular de entre 42168 compuestos que componían la librería comercial diversa del CNIO. Esta librería fue adquirida a siete proveedores diferentes (BioFocus, Calbiochem, Life Productos químicos, Asinex, Enamine y Aurora). Los proveedores habían verificado experimentalmente por cromatografía líquida- espectrometría de masas (LC/MS) o / y resonancia magnética nuclear (RMN) que cada compuesto tenía por gramo un 95% de pureza

La selección se realizó aplicando criterios des de la perspectiva química y des de el punto de vista biológico, estructuras enfocadas en quinasas (bibliotecas de quinasas) para explorar los diferentes espacios químicos con un potencial de actividad biológica. La librería enfocada de 1088 compuestos fue seleccionada tanto por la estructura de los compuestos como por la interacción de los ligandos para encontrar inhibidores de CDK8. De acuerdo con nuestros criterios iniciales, los valores de peso molecular para compuestos seleccionados tenían que tener preferiblemente un peso molecular entre $300 \leq 400$ y valores de solubilidad estimados lo más cercano posible $100\mu\text{M}$ o más alto. Este umbral para los valores estimados de solubilidad se adaptó por serie, una vez que los valores experimentales estuvieron disponibles.

Por otro lado, se testaron 1539 compuestos procedentes de una librería de la Universidad de Johns. Hopkins (JHU) constituida por una colección de drogas aprobadas por la FDA. Los hits

identificados a partir de la librería enfocada, a pesar de cumplir con las 5 reglas de Lipinski, seguramente requerirían una optimización hasta conseguir un fármaco, mientras que de la librería JHU se podría pensar en un reposicionamiento, es decir, encontrar una nueva aplicación terapéutica distinta para la que fue inicialmente diseñado el fármaco.

Los dos escrutinios se llevaron a cabo de forma independiente en un proceso robotizado y con los parámetros de calidad propios de los procesos de Desarrollo de Fármacos descritos en el apartado 5.1. Los compuestos procedentes de ambas librerías fueron ensayados por duplicado a una sola concentración (10 μ M para los compuestos de la librería del CNIO y 1 μ M para la librería de JHU).

En esta primera fase los criterios de selección fueron más permisivos con el fin de no descartar potenciales compuestos activos menos potentes pero con opción de mejorar dicha actividad. Se estableció un punto de corte por encima del 70% y 60% de inhibición, lo que permitió la identificación de 85 compuestos de la librería enfocada del CNIO y 26 compuestos en el caso de la librería de reposición JHU (Tabla 12).

	Librería CNIO	Librería JHU	% de hits
Compuestos ensayados	1088	1589	
Concentración	10 μ M	1 μ M	
Inhib. \geq 60%		26	1,68
Inhib. \geq 70%	85		0,90

Tabla 12. Resultados de los escrutinios para la identificación de compuestos activos inhibidores de CDK8.

Mediante los diagramas de dispersión de las dos librerías se observó una buena correlación entre las dos réplicas ensayadas en los dos escrutinios tanto para los compuesto activos, en verde, o inactivos en rojo (Fig. 54A y B).

El perfil de los compuestos ensayados correspondientes a la librería CNIO se ajustó a una distribución gaussiana. En el extremo izquierdo de la gráfica (barras verde), se agruparon la población de compuestos activos (Fig. 54C). Respecto a la librería JHU, se observó menor diversidad en la distribución de los compuestos y un porcentaje significativamente menor de compuestos activos primarios respecto a la librería del CNIO (Fig. 54D).

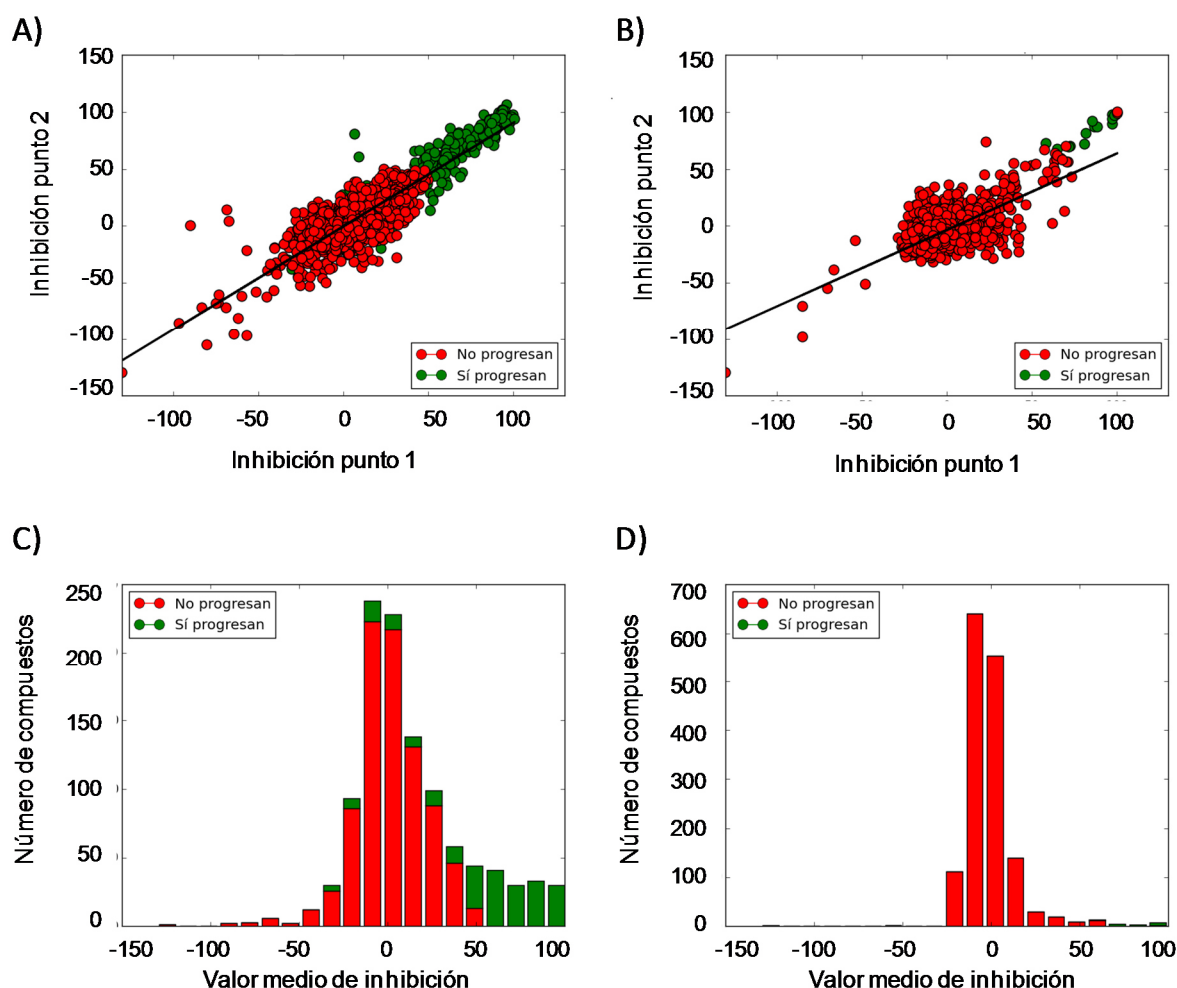


Figura 54. Representación de los resultados del cribado.

Diagramas de dispersión de las dos librerías de compuestos. A) Librería CNIO y B) Librería JHU. Histogramas de la distribución de los valores medios de inhibición. C) Librería CNIO y D) Librería JHU. *Software Python 3.5 módulos Matplotlib y pandas.pydata.org*

Todos los compuestos que pasaron el corte de actividad a punto simple se testaron en dosis respuesta por duplicado. En este caso se estableció un segundo filtro mas restrictivo considerándose como compuestos activos aquellos con un IC_{50} bioquímico inferior a $1\mu M$. Con estos criterios fueron seleccionados 40 compuestos activos con valores de IC_{50} inferiores a $0.5\mu M$ procedentes de la librería enfocada del CNIO y 14 compuestos activos con una IC_{50} inferior a $1\mu M$ procedentes de la librería JHU. Los 14 candidatos preseleccionados de la librería JHU fueron testados en el ensayo celular que mide la inhibición de la actividad β -CATENINA mediante un ensayo reportero de actividad transcripcional (apartado 3.3.2 de M&M), resultaron negativos y por consiguiente fueron descartados en esta fase. De los 40 hits de la librería enfocada del CNIO que pasaron el filtro bioquímico se testaron en el ensayo celular de β -CATENINA, y tras aplicar un punto de corte de $IC_{50} \leq 5\mu M$ se seleccionaron 4 compuestos activos para la fase de generación de nuevos compuestos activos pertenecientes a 3 series químicas diferentes (Tabla 13) y también se incluyó el Sorafenib como ligando conocido para utilizarlo en el diseño racional de nuevos compuestos activos.

Compuestos	Hit	CDK8 IC_{50} (nM)	β -catenina EC_{50} (nM)
ETP-045	Hit 1	14.1 ± 0.4	1584 ± 30
ETP-567	Hit 2	76.4 ± 2.6	968 ± 45
ETP-609	Hit 3	19.2 ± 0.5	432 ± 2
Sorafenib *	Hit 4	24.2 ± 1.2	1140 ± 22
ETP-190	Hit 5	46.3 ± 2.3	1270 ± 4

Tabla 13. Compuestos seleccionados del escrutinio de la librería enfocada del CNIO y basados en ligando (*).

4.2.2. Generación de nuevas series químicas para ampliar el espacio químico y la selección del compuesto cabeza de serie.

A partir de los 5 cabeza de serie identificados en el escrutinio descrito anteriormente, la sección de Química Médica realizó una pequeña exploración química alrededor de los mismos, tanto de manera individual como combinando la información estructural de dos de ellos, mediante la introducción de variaciones en la molécula para la generación de nuevos análogos con mejores cualidades en relación a la potencia, selectividad, modulación de las propiedades ADME-T, adquisición de propiedad intelectual y generar conocimiento sobre el modo de unión de los compuestos, al objeto de generar nuevas moléculas con propiedades mejoradas respecto a las moléculas de partida y escoger una serie química para la optimización del cabeza de serie o Hit o Lead (HtL).

Dicha exploración permitió la generación de 29 compuestos pertenecientes a 12 series químicas diferentes, entendiendo por serie química aquellos compuestos que comparten un mismo farmacóforo con sustituciones diferentes (Tabla 14). Las series 9 a 12 se generaron con el fin de obtener información sobre el modo de unión de los compuestos y las interacciones más importantes, pero no se tuvieron en cuenta para su priorización para la fase de HtL.

Para priorizar las otras 8 series con propiedad intelectual se aplicaron los siguientes criterios de selección:

1. Potencia frente a CDK8 y selectividad en un panel de 456 quinasas (KinomscanTM) para ellos se escogió un compuesto como representante de la serie química. Se consideró el valor de S(35) (descrito en el apartado 3.2 de M&M) para la priorización de las series.

2. Propiedades ADME-T aceptables: estabilidad microsomal y permeabilidad (PAMPA)

Compuestos	Hit para diseño	Serie química	CDK8 IC ₅₀ (nM)	β-catenina EC ₅₀ (nM)
ETP-689	1 y 2	1	1,1	576
ETP-717	1y 2	1	1,4	320
ETP-669	1y 2	1	2,6	158
ETP-775	4	2	6,5	5940
ETP-738	4	2	9,9	6820
ETP-778	4	2	411,0	1220
ETP-751	3	3	2,4	154
ETP-737	3	3	13,5	120
ETP-782	3	3	30,0	1330
ETP-670	1	4	1,4	32
ETP-753	1	4	1,4	72
ETP-755	1	4	1,8	195
ETP-749	3	5	2,4	1190
ETP-750	3	5	146,0	N/A
ETP-727	3	5	484,0	2580
ETP-281	5	6	31,1	337
ETP-189	5	6	40,5	1920
ETP-653	1 y 2	7	793,0	N/A
ETP-779	5	8	910,0	N/A
ETP-545	1	9	3,6	122
ETP-585	1	9	1,4	300
ETP-799	1	9	2,9	369
ETP-508	2	10	16,7	552
ETP-664	2	10	23,6	2960
ETP-745	3	11	2,62	105
ETP-767	3	11	28,4	156
ETP-825	1y 2	12	366	N/A

Tabla 14. Caracterización de los 29 análogos generados pertenecientes a 12 series químicas diferentes en la primera fase exploratoria.

Valores de la IC₅₀ en el ensayo bioquímico de CDK8 y celular (β-CATENINA). N/A no adquirido. Los resultados representados son el promedio de al menos dos datos cuya dispersión fuera inferior a 2 veces la desviación estándar.

La priorización de las series químicas siguiendo estos criterios fue la siguiente (Tabla 15):

Serie 1: Los compuestos de esta serie química fueron potentes, pero poco selectivos en el panel del kinomesca (S(35)=0.213) y además poco estables en microsomas y con una permeabilidad baja. Por ello, se descartó.

Serie 2: Los compuestos de esta serie resultaron ser potentes y selectivos (S(35)=0.033), pero presentaron problemas de permeabilidad y estabilidad en microsomas. Por ello, esta serie se reservó inicialmente, sin ser descartada totalmente.

Serie 3: Los compuestos de esta serie fueron potentes pero no selectivos (S(35)=0.349) y por ello la serie fue descartada.

Serie 4: Los compuestos de esta serie más potentes resultaron ser poco selectivos (S(35)=0.349), sustituciones en uno de sus anillos permitía ganar en selectividad (S(35)=0.033), pero perdían potencia, aparte de tener problemas de estabilidad microsomal, por ello la serie se apartó sin ser descartada totalmente.

Serie 6: Los compuestos de esta serie, a pesar de ser potentes en la inhibición de CDK8, no se consiguió eliminar otras actividades de otros dianas en los que había trabajado el grupo y por ello se descartó.

Serie 7 y 8: Los compuestos que se sintetizaron fueron poco potentes y dado que había series con mejores propiedades no se desarrollaron más.

Serie 5: Los compuestos pertenecientes a esta serie mostraron el mejor perfil, en relación a la potencia, selectividad (S(35)=0.051) y con buena permeabilidad y una estabilidad microsomal aceptable aunque mejorable.

Serie Química	IC ₅₀ CDK8 < 100nM	Kinomesan™ S(35) <0.1	Permeabilidad (PAMPA) > 1,5- E-6cm/s	Estabilidad microsomal >30%	Selectividad panel interno quinasas
1	✓	✗	✗	✗	N/A
2	✓	✓	✗	✗	N/A
3	✓	✗	N/A	N/A	N/A
4	✓	✗	✓	✗	N/A
5	✓	✓	✓	✓	N/A
6	✓	N/A	N/A	N/A	✗
7	✗	N/A	N/A	N/A	N/A
8	✗	N/A	N/A	N/A	N/A

Tabla 15. Caracterización de las series químicas para su priorización.

4.3. Caracterización de las moléculas de partida de la serie 5 selecciona para la fase de HtL.

La serie 5 fue seleccionada para abordar la segunda fase exploratoria y la generación de nuevos análogos. Las tres moléculas diseñadas hasta el momento compartían el farmacóforo de la Fig. 55A con modificaciones donde R6 y R7 era la única sustitución diferente entre compuestos.

Las 3 moléculas sintetizadas inicialmente de esta serie química se caracterizaron a nivel bioquímico y de propiedades ADME-T (Fig. 55 B y C).

Después de evaluar los perfiles de las actividades biológicas, fue seleccionado el compuesto más potente de los tres candidatos, el ETP-749 con una potencia de IC₅₀ de 3nM, dos ordenes de magnitud respecto a los otros dos candidatos, exhibiendo el mejor perfil en relación a las propiedades estudiadas.

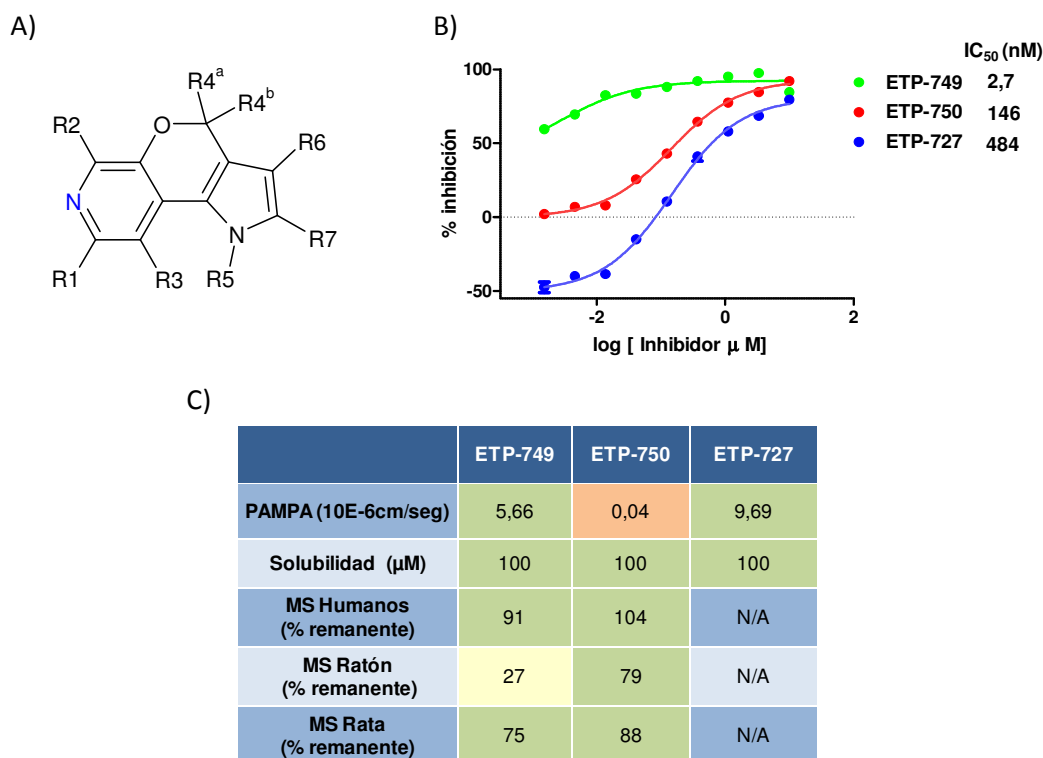


Figura 55: Caracterización de los compuestos de la serie 5. A) Farmacóforo de la serie 5. B) Curvas de dosis-respuesta de los tres compuestos iniciales. C) Perfil AMDE-T.

La selectividad del compuesto ETP-749 fue evaluada frente a un panel de 456 quinasas mediante un ensayo de unión (Kinomescan™ descrito en el apartado 3.2 de M&M, Fig. 56), solo 20 quinasas mostraron un porcentaje de unión respecto al control inferior al 35% ($S(35)=0.051$). HASPIN resultó ser la quinasa con menor porcentaje respecto al control de 0.65%. Por ello se puso a punto un ensayo bioquímico para determinar su IC₅₀ (apartado 3.1.5 de M&M). Recaltar que la CDKs que están incluidas en el panel del kinomescan no están acomplexadas con su correspondiente ciclina y por ello se decidió establecer un ensayo de unión o bioquímico para poder medir dichas actividades (apartados 3.1.1 y 3.1.2 de M&M). Se establecieron ensayos para las CDKs relacionadas tanto con ciclo celular (CDKs 1, 2, 4 y 6) como las denominadas CDKs transcripciones (CDKs 7 y 9) y CDK19 el parálogo de CDK8[95][272].

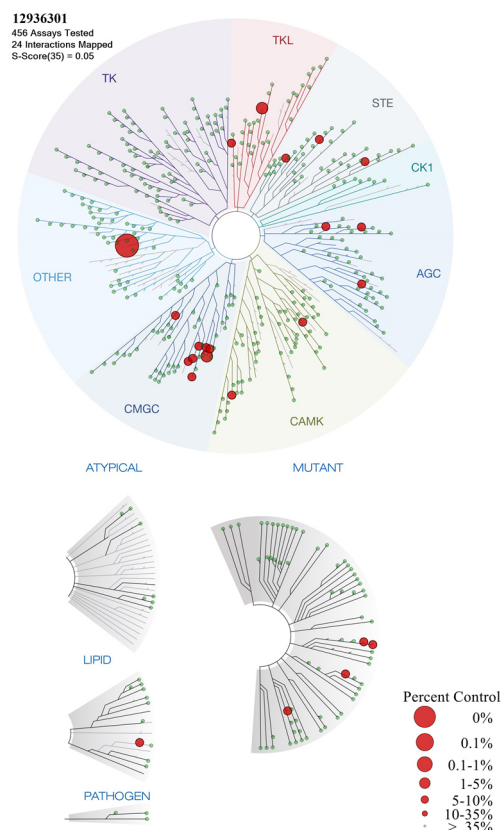


Figura 56. Mapa de interacciones. “Tree-spotTM” del ET-749 a 1 μ M.

Respecto al panel de CDKs, observamos que el ETP-749 era muy selectivo frente a todas las CDKs estudiadas con diferencias de potencia observada que oscilaron entre 4 y 2 órdenes de magnitud en función de la CDK, excepto lo esperado para CDK19 que está considerado como un parálogo de CDK8 (Fig. 57). Respecto a HASPIN, el compuesto mostró ser un inhibidor potente con una IC₅₀ de 38,1nM.

Tanto las propiedades físico-químicas que condicionan la biodisponibilidad del compuesto, como la solubilidad, el transporte a través de membranas o permeabilidad junto al metabolismo de los fármacos y la toxicidad cardíaca son aspectos de vital importancia para alcanzar niveles de eficiencia terapéutica y la seguridad biológica. Por ello, es fundamental tener en cuenta el comportamiento del compuesto en los procesos que conforman el ADME-T

e incorporarlos a los diferentes estadios para la priorización de los compuestos pre-líderes y líderes.

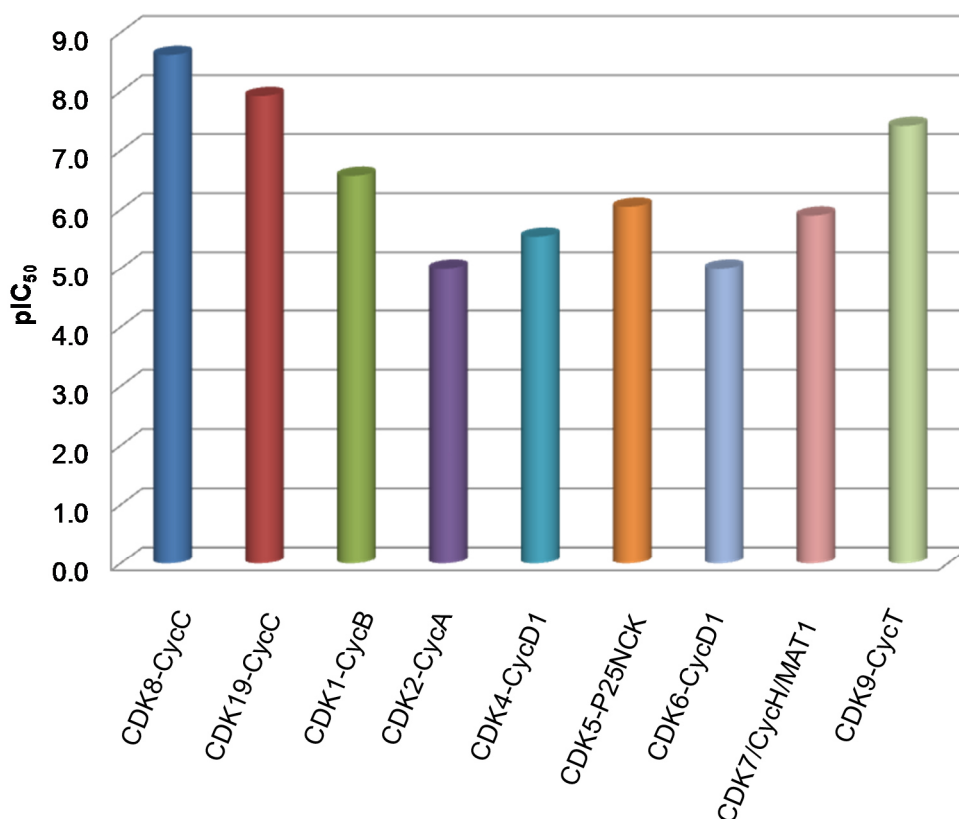


Figura 57. Inhibición de un panel de CDKs del ETP-749.

Datos de potencia expresados en pIC₅₀. Los datos son el promedio de al menos dos datos cuya dispersión fuera inferior a 2 veces la desviación estándar.

Respecto a los ensayos de estabilidad en microsomas, en dos de las tres especies estudiadas (MS humano, MS ratón y MS rata), el compuesto ETP-749 mostró muy buena estabilidad en términos generales, lo que indicó que el compuesto era estable cuando se exponía frente al sistema enzimático de biotransformación donde participan las isoformas del sistema P450 que intervienen en los procesos de eliminación de fármacos. Sin embargo, en el caso de MS de ratón, el compuesto mostró una estabilidad baja, con el 27.15% de compuesto recuperado (Fig. 58A), siendo la estabilidad en ratón un parámetro a optimizar en el proceso de

HtL para mejorar la estabilidad del compuesto frente al sistema de las enzimas que participan en el proceso de las reacciones oxidativas de fase I.

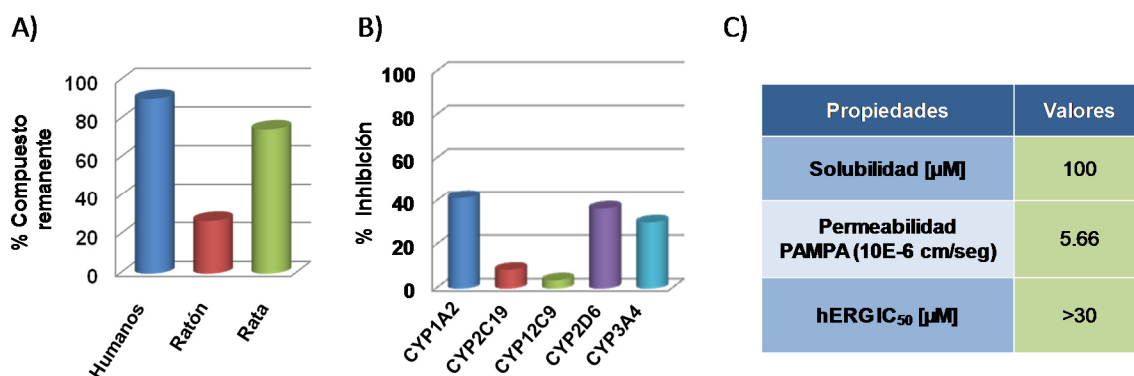


Figura 58. Caracterización ADME-T del ETP-749.

A) Estabilidad microsomal. B) Inhibición de citocromos P450 a 5μM. C) Salubridad en medio acuoso, permeabilidad y cardiotoxicidad.

También se realizó un ensayo para evaluar si el compuesto era inductor o modulador de la función enzimática de las diferentes isoformas que conforman el sistema CYP450 (apartado 3.4.4 de M&M). Estos estudios mostraron que el compuesto ETP-749 no presentaba un efecto de modulación significativo sobre los diferentes CYP450 estudiados (Figura 58B), ya que de las 5 isoformas, estudiadas la máxima modulación fue la de la isoforma CYP1A2 por debajo del 42% de inhibición a la 5μM (una de las isoformas con menor participación en los procesos metabólicos de xenobióticos).

Respecto a las propiedades fisicoquímicas de solubilidad, permeabilidad y el marcador de citotoxicidad cardíaca hERG (Figura 58C), los resultados indicaron que el compuesto ETP-749, era soluble a una concentración de 100μM en medio acuoso. El estudio de permeabilidad, a través de membranas plasmáticas simuladas (PAMPA), demostró que el compuesto tenía una buena permeabilidad. Por último, en los estudios de citotoxicidad cardíaca, donde se midió la unión al canal de potasio hERG, a la máxima concentración ensayada de 30 μM, no se observó unión.

4.4. Fase de Optimización de propiedades del cabeza de serie “Hit to Lead” (HtL).

La fase de optimización del cabeza de serie hasta obtener un compuesto líder, HtL, conllevó la generación de nuevos análogos por medio de variaciones estructurales introducidas en el farmacóforo de la molécula de partida, ETP-749, en las posiciones indicadas en la Fig. 59A con el objetivo de establecer relaciones estructura-afinidad (SAR) y estructura-propiedades (SPR). Esta fase de HtL es un proceso multifactorial que implicó por un lado una exploración químico-médica de todas las posiciones de la molécula y, a su vez, una caracterización extensiva de los valores generados tanto a nivel bioquímico, celular, como de propiedades ADME-T que aportaron una información esencial para la optimización del cabeza de serie.

Se introdujeron diferentes patrones de sustitución en cada una de las posiciones tanto de manera individual, como combinando 2 o más posiciones, generándose 97 análogos. En la Fig. 59A y la Tabla suplementaria 1 se puede observar en que posiciones estaban sustituidos todos estos análogos, donde en R4 se han incluido tanto aquellos compuestos con sustitución en R4^a y R4^b, y no se ha trabajado con compuestos quirales sino con enantiómeros puros. En primer lugar, todos los compuestos se caracterizaron para su inhibición frente a CDK8 (Fig. 59B) y, paralelamente, para su inhibición en HASPIN (Fig. 65C), ya que se identificó como la principal actividad paralela en el ETP-749. El 38% de los análogos sintetizados presentaron una IC₅₀ para la inhibición de CDK8 inferior a 100nM, como se puede observar en la Figura 59A, todos los compuestos con la doble sustitución en R4 Y R5 presentaron una IC₅₀ para CDK8 inferior a 10nM, y a su vez entre los compuestos mono sustituidos en R4 o R5 se encontraban el resto de inhibidores con IC₅₀ inferior a 10nM. Destacar que el 60% de los compuestos monosustituidos

en R4 o R5 presentaron una IC_{50} para CDK8 inferior a 100nM. Por lo tanto, las posiciones R4 y R5 se identificaron como claves para mejorar la potencia en CDK8.

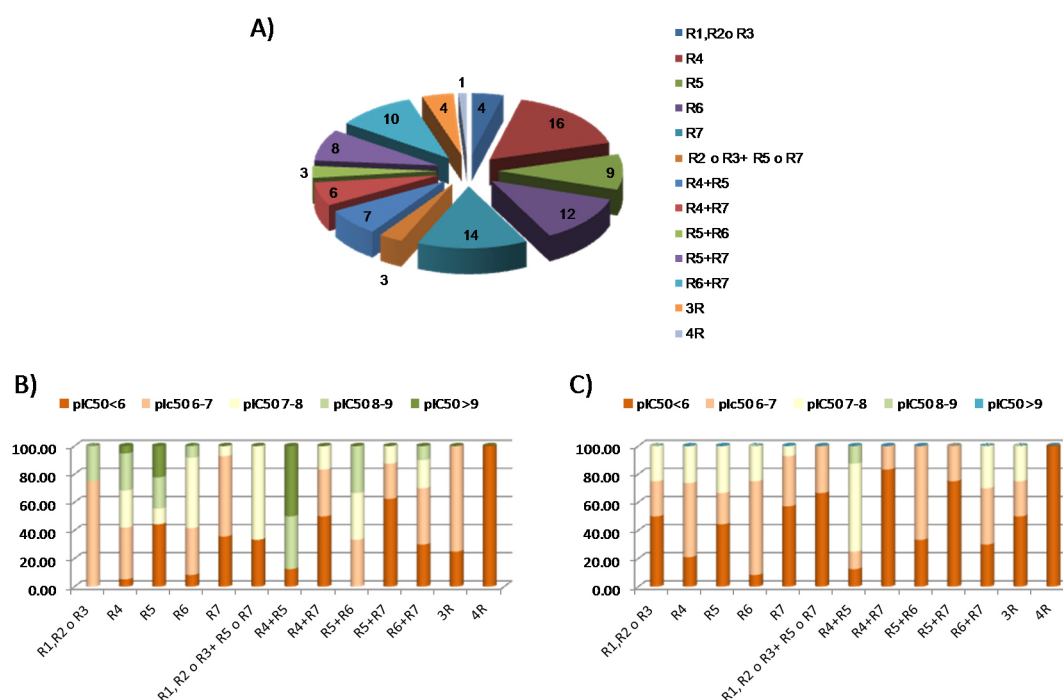


Figura 59. Histograma que compara el porcentaje de análogos sintetizados en la fase de HtL y su inhibición frente a CDK8 y HASPIN.

A) Posiciones sustituidas y número de análogos generados. B y C) Inhibición de CDK8 y HASPIN, pIC_{50} , en función de la sustitución respectivamente. Se representa el % de compuestos sustituidos en la posición indicada con el valor de pIC_{50} correspondiente.

Respecto a la inhibición de HASPIN, se observó que, en general, los compuestos eran un orden de magnitud menos activos en HASPIN que en CDK8 (Fig. 59B y C). Los compuestos doblemente sustituidos en R4 y R5 fueron los que presentaron inhibiciones de HASPIN mayores y los sustituidos en R5 y R6 resultaron ser los más selectivos.

Compuesto	Estructura (Sustitución)	CDK8 IC ₅₀ (M)	HASPIN IC ₅₀ (M)	Actividad HASPIN vs CDK8
ETP-927	R4	4,06E-10	2,75E-08	67,73
ETP-062	R4	6,34E-09	2,22E-07	35,02
ETP-064	R4	4,46E-09	4,06E-07	91,03
ETP-926	R4	4,50E-09	8,48E-08	18,84
ETP-410	R4	1,09E-08	1,51E-07	13,85
ETP-936	R4	1,11E-08	2,47E-07	22,25
ETP-889	R4	3,11E-08	5,29E-08	1,70
ETP-449	R4	5,47E-08	2,06E-07	3,77
ETP-827	R5	4,97E-10	2,06E-08	41,45
ETP-846	R5	5,15E-10	2,18E-08	42,33
ETP-002	R5	1,98E-09	8,74E-08	44,14
ETP-832	R5	7,75E-09	2,05E-07	26,45
ETP-887	R5	2,16E-08	3,10E-07	14,35
ETP-003	R6	9,02E-09	2,66E-08	2,95
ETP-448	R6	1,23E-08	9,06E-08	7,37
ETP-430	R6	2,62E-08	2,35E-07	8,97
ETP-921	R6	2,62E-08	1,46E-07	5,57
ETP-414	R6	2,97E-08	7,32E-08	2,46
ETP-886	R6	3,19E-08	3,21E-07	10,06
ETP-009	R6	5,49E-08	3,96E-06	72,13
ETP-018	R4+R5	1,91E-10	2,62E-08	137,17
ETP-048	R4+R5	4,66E-10	2,76E-08	59,23
ETP-154	R4+R5	2,62E-10	8,51E-09	32,48
ETP-191	R4+R5	3,14E-10	1,70E-08	54,14
ETP-192	R4+R5	3,83E-09	1,38E-07	36,03
ETP-193	R4+R5	2,09E-09	1,07E-08	5,12
ETP-178	R4+R5	1,11E-09	3,86E-08	34,77
ETP-266	R6+R7	7,69E-09	2,74E-06	356,31
ETP-263	R6+R7	5,25E-08	8,93E-08	1,70
ETP-922	R6+R7	7,85E-08	6,83E-07	8,70
ETP-175	R3	2,1E-09	3,18E-08	15,14
ETP-906	R7	9,22E-08	1,8E-07	1,95
ETP-765	R3+R5	5,55E-08	1,7E-06	30,63
ETP-176	R3+R7	1,33E-08	1,51E-07	11,35
ETP-055	R5+R6	3,23E-09	3,54E-07	109,60
ETP-088	R5+R6	2,08E-08	2,46E-07	11,83
ETP-983	R5+R7	6,11E-08	6,48E-07	10,61

Tabla 16. Inhibición de CDK8 y HASPIN y la relación entre las dos actividades para los análogos con una IC₅₀ para CDK8 inferior a 100nM.

Resaltados en azul oscuro los compuestos con un perfil claramente selectivo para CDK8. Los datos son el promedio de al menos dos datos cuya dispersión fuera inferior a 2 veces la desviación estándar.

Para confirmar que las actividades detectadas a nivel bioquímico eran trasladables a un entorno mucho más complejo como es la célula, se estudió la modulación de los biomarcadores STAT1-Ser727 para CDK8 y H3-Thr3, para HASPIN, para los inhibidores con inhibición de CDK8 inferior a 10nM, buscando identificar los inhibidores más potentes. Este análisis se

realizó en la línea SW620 por sobreexpresar CDK8 y por ello presentar niveles basales altos de STAT1P sin necesidad de estimular con INF- γ y a su vez presentar niveles basales altos de H3-Thr3 sin necesidad de sincronizar las células. En general, se observó una correlación de la actividad inhibitoria y potencia detectada en el ensayo bioquímico con respecto a la inhibición de la fosforilación de los biomarcadores en el ensayo celular (Tabla 17). El ETP-266 que era el compuesto con mayor selectividad a nivel bioquímico resultó ser inactivo en células, posiblemente porque la sustitución que se le introdujo afecta a la permeabilidad celular. Nuevamente se establecieron 3 puntos de corte, y los ETP-064 y ETP-055 resultaron ser los más selectivos para CDK8 en un sistema mucho más complejo como es la célula, seguido del ETP-018, aunque en este caso todavía presentó una modulación de HASPIN en células considerable. El resto de análogos se consideraron compuestos duales CDK8 / HASPIN.

Compuesto	Estructura (sustitución)	CDK8 IC ₅₀ (M)	HASPIN IC ₅₀ (M)	STAT1_SER727 EC ₅₀ (M)	H3_THR3 EC ₅₀ (M)	Ratio selectividad HASPIN vs CDK8
ETP-018	R4+R5	1,91E-10	2,62E-08	9,50E-10	9,70E-08	102,11
ETP-154	R4+R5	2,62E-10	8,51E-09	2,80E-09	2,42E-08	8,64
ETP-191	R4+R5	3,14E-10	1,70E-08	2,65E-09	4,37E-08	16,49
ETP-927	R4	4,06E-10	2,75E-08	5,00E-09	3,77E-08	7,54
ETP-048	R4+R5	4,66E-10	2,76E-08	1,70E-09	2,62E-08	15,41
ETP-827	R5	4,97E-10	2,06E-08	1,73E-10	1,60E-09	9,25
ETP-846	R5	5,15E-10	2,18E-08	4,20E-08	9,60E-08	2,29
ETP-178	R4+R5	1,11E-09	3,86E-08	6,00E-10	1,00E-08	16,67
ETP-002	R5	1,98E-09	8,74E-08	7,00E-10	2,82E-08	40,29
ETP-193	R4+R5	2,09E-09	1,07E-08	1,55E-09	5,22E-09	3,37
ETP-175		2,10E-09	3,18E-08	3,80E-09	7,30E-09	1,92
ETP-055	R5+R6	3,23E-09	3,54E-07	4,10E-09	2,69E-07	65,61
ETP-192	R4+R5	3,83E-09	1,38E-07	3,43E-09	1,15E-07	33,53
ETP-064	R4	4,46E-09	4,06E-07	2,70E-08	2,87E-06	106,30
ETP-926	R4	4,50E-09	8,48E-08	2,50E-08	3,40E-08	1,36
ETP-062	R4	6,34E-09	2,22E-07	3,34E-08	1,93E-07	5,78
ETP-266	R6+R7	7,69E-09	2,74E-06	1,00E-05	1,00E-05	1,00
ETP-832	R5	7,75E-09	2,05E-07	3,30E-08	2,30E-07	6,97
ETP-003	R6+R7	9,02E-09	2,66E-08	1,76E-08	3,15E-08	1,79

Tabla 17. Inhibición celular de CDK8 y HASPIN para los análogos con IC₅₀ para CDK8 inferior a 10nM. Se resaltan en azul oscuro los compuestos realmente selectivos para CDK8 a nivel celular.

A continuación se caracterizaron los compuestos a nivel bioquímico para estudiar su selectividad frente a otras CDKs. Dentro de la familia de las CDKs podemos distinguir las transcripcionales donde se incluye CDK8 y su parólogo CDK19, CDK9 y CDK7 y por otro lado, tenemos las reguladoras del ciclo celular donde se estudió CDK1, CDK2, CDK4, CDK5 y CDK6.

Como era de esperar se observó que los compuestos tenían un rango de potencia parecido para CDK19 dada la elevada analogía estructural y similitud entre secuencias de las dos proteínas consideradas como parálogos, que intercambian su papel en el módulo quinasa del complejo Mediador (Fig. 60 y Tabla suplementaria 2) [54]. Todos los análogos resultaron ser selectivos frente a CDK4 y CDK6 con inhibiciones entre 1 y 10 μ M. También presentaron una alta selectividad frente a CDK1 y CDK2 ya que solo un 25% de los análogos presentaron cierta inhibición pero en el rango nanomolar alto y en el caso de CDK5 un 50% de los compuestos mostraron inhibiciones en el rango nanomolar alto y solo un compuesto presentó una inhibición por debajo de 100nM. Respecto a las CDKs transcripcionales, los análogos resultaron ser muy selectivos frente a CDK7, mientras que CDK9 resultó ser la menos selectiva, con un 33% de los compuestos con inhibiciones por debajo de 100nM. Para estos compuestos se evaluó su inhibición a nivel celular, CDK9 fosforila a la RNA polimerasa II en la Ser5, para todos los compuestos la inhibición resultó ser micromolar. Por lo tanto, en global, concluimos que los análogos sintetizados eran altamente selectivos frente a otras CDKs, independientemente de que fueran más o menos selectivos frente a HASPIN.

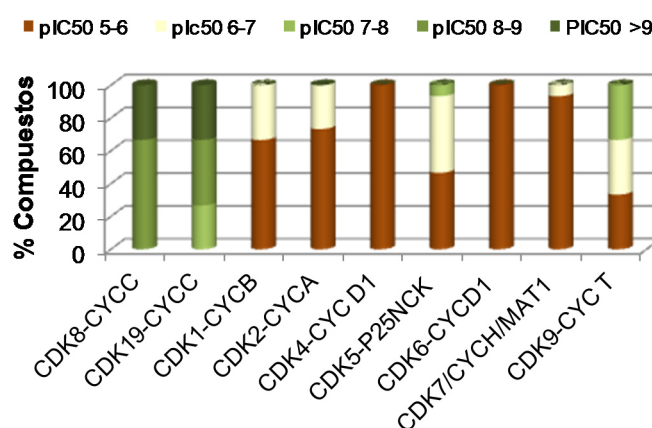


Figura 60. Caracterización de la inhibición de CDKs para los análogos con IC₅₀ para CDK8 inferior a 10nM.

Una vez establecidas las correlaciones estructura-afinidad se procedió a caracterizar los compuestos a nivel de ADME-T para poder establecer relaciones estructura-propiedades y

seleccionar así los compuestos con mejores propiedades para su caracterización farmacológica en ratones.

De los 38 compuestos con inhibición para CDK8 inferior a 100nM se seleccionaron aquellos con inhibición inferior a 10nM (19 compuestos) ya que se cubrían todas las posiciones analizadas (Fig. 61A y Tabla suplementaria 3). En primer lugar, se analizó la solubilidad en medio acuoso y la permeabilidad en membranas artificiales para ayudar a la interpretación de los datos celulares y para prever posibles problemas de precipitación y absorción en los estudios de farmacocinética en ratones. La mayoría de los compuestos resultaron ser muy solubles en medio acuoso, superior a 100µM, y muy permeables en el ensayo de PAMPA, superior a 1.5×10^{-6} cm/s (Fig. 61B y C). Solo el ETP-266 resultó tener una nula permeabilidad pasiva, lo que explica el resultado negativo que se obtuvo en el ensayo celular. Y el ETP-832 resultó tener una baja solubilidad lo que podría tener implicaciones en los estudios de farmacocinética.

A continuación, estudiamos la estabilidad metabólica de los compuestos en un sistema *in vitro* como son los microsomas donde tienen lugar los procesos de biotransformación de fase I. Estudiamos la estabilidad en microsomas aislados de tres especies: humanos, de ratón y de rata. En humanos, pues el objetivo final era el desarrollo de un fármaco para su uso en humanos, en ratón, por tratarse del modelo experimental *in vivo*, y en rata, por tener otra especie de roedor con un metabolismo más bajo al ratón y más similar al humano. Analizamos mediante espectrometría de masas la cantidad de compuesto remanente tras incubarlo con los microsomas (ver detallan en M&M apartado 3.4.3). La mayoría de los compuestos fueron estables en microsomas humanos (compuesto remanente superior al 70%), en rata presentaron una estabilidad intermedia y en ratón algo más de la mitad de los compuestos tenían una estabilidad aceptable para poder ser seleccionados para farmacocinética (Fig. 62A y Tabla suplementaria 3), pues recordemos que este es un sistema *in vitro* y no siempre se obtiene una buena

correlación con los datos *in vivo*. La estabilidad de los compuestos, al menos en ratón, resultó ser un parámetro a optimizar en la siguiente fase del descubrimiento de fármacos.

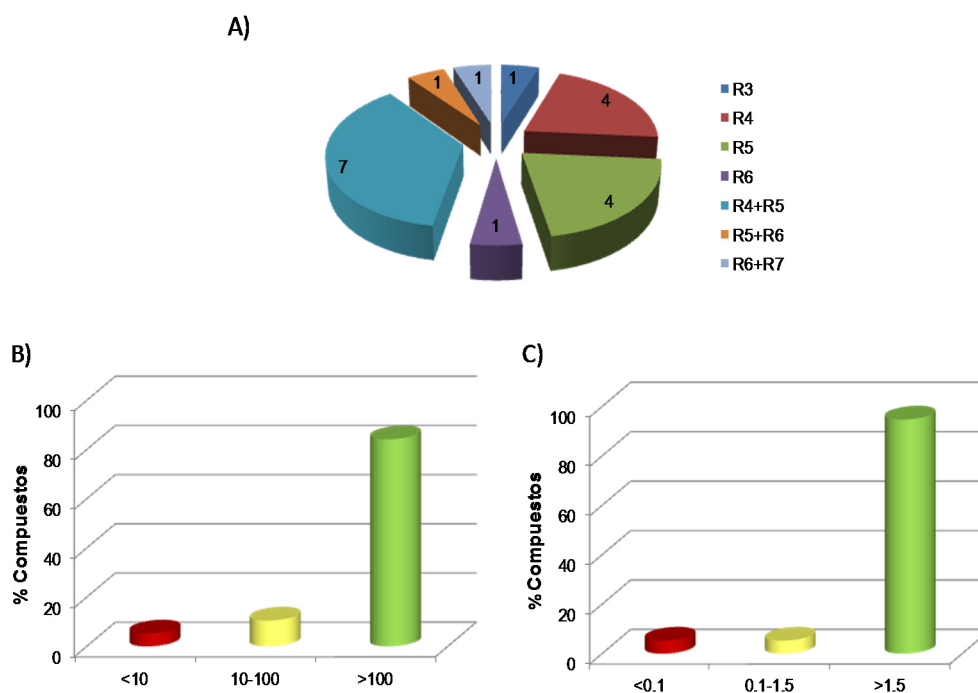


Figura 61. Compuestos seleccionados para ADME-T, solubilidad y PAMPA

A) Distribución según la sustitución de los compuestos seleccionados para ADME-T. B) Distribución de los compuestos según su solubilidad en medio acuoso. C) Distribución de los compuestos según su permeabilidad en membranas artificiales. Código de colores: verde alta, amarillo intermedia y rojo baja.

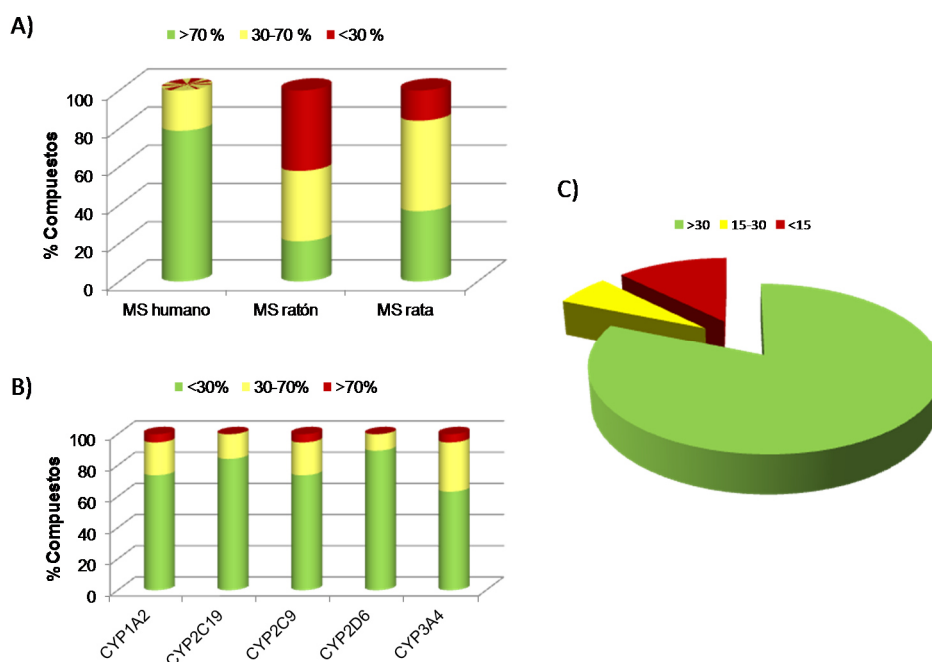


Figura 62. Perfilado ADME-T de análogos sintetizados en la fase de HtL.

A) Distribución de los compuestos según su estabilidad metabólica en microsomas humanos, de ratón y rata. Compuestos estables en verde (más del 70 % de compuesto remanente), estabilidad media en amarillo (entre el 70-30% de compuesto remanente) y baja estabilidad en rojo (menos del 30% de compuestos remanente). B) Distribución de los compuestos según el porcentaje de inhibición a 5µM en las cinco formas indicadas de P450. Inhibición alta superior al 70% en rojo, inhibición intermedia entre el 70 y el 30% en amarillo e inhibición baja inferior al 30% en verde. C) Distribución de los compuestos según la inhibición del canal de potasio humano ERG. Compuesto no cardiotoxico con IC₅₀ superior a 30µM en verde, cardiotoxicidad intermedia con IC₅₀ entre 15 y 30µM en amarillo y alto riesgo de cardiotoxicidad con IC₅₀ inferior a 15µM en rojo.

A continuación, se estudió la modulación de la actividad enzimática de las diferentes isoformas del sistema P450, para poder descartar compuestos que pudieran producir interacción entre fármacos cuando se administraran en combinación. Se observó que, mayoritariamente, los análogos seleccionados no presentaban una inhibición significativa (inhibición superior al 70% en punto simple) sobre las 5 isoformas estudiadas (Fig. 62 B y Tabla suplementaria 4). Solo un 5% de los compuestos, en concreto el ETP-018 y ETP-055 presentaron un inhibición significativa para las isoformas CYP1A2 y CYP2C9 y el CYP3A4 respectivamente. En el caso del ETP-055 se determinaron los valores de IC₅₀ y resultaron estar entre 2 y 10µM.

Y por último, se evaluó el posible riesgo de seguridad cardíaca. Se midió la inhibición de los canales de potasio expresados en corazón, hERG. En el 80% de los compuestos

estudiados, la inhibición fue superior a la concentración máxima ensayada de 30 μ M (Fig. 62C y Tabla suplementaria 4). Por tanto, la serie química en general no presentó riesgo de toxicidad cardíaca.

Se seleccionaron los análogos con un perfil más interesante tras el análisis global de los datos bioquímicos, celulares y de ADME-T para estudiar su perfil farmacocinético en ratones BalbC. Al analizar la acción en células de los inhibidores, se había descartado uno de los compuestos más selectivos respecto a HASPIN por su falta de actividad celular, el ETP- 266. Los otros dos compuestos más selectivos el ETP-055 y el ETP-064, se decidió no progresarlos a PK por el momento, por una estabilidad microsomal intermedia tanto en ratón como en rata y en el caso del ETP-055 también en humano, además el ETP-064 presentaba una permeabilidad intermedia (Tabla suplementaria 3), dado que en la fase de LO uno de los objetivos era mejorar la estabilidad de los compuestos, en caso de no conseguirlo se recuperarían estos compuestos para progresarlos a PK.

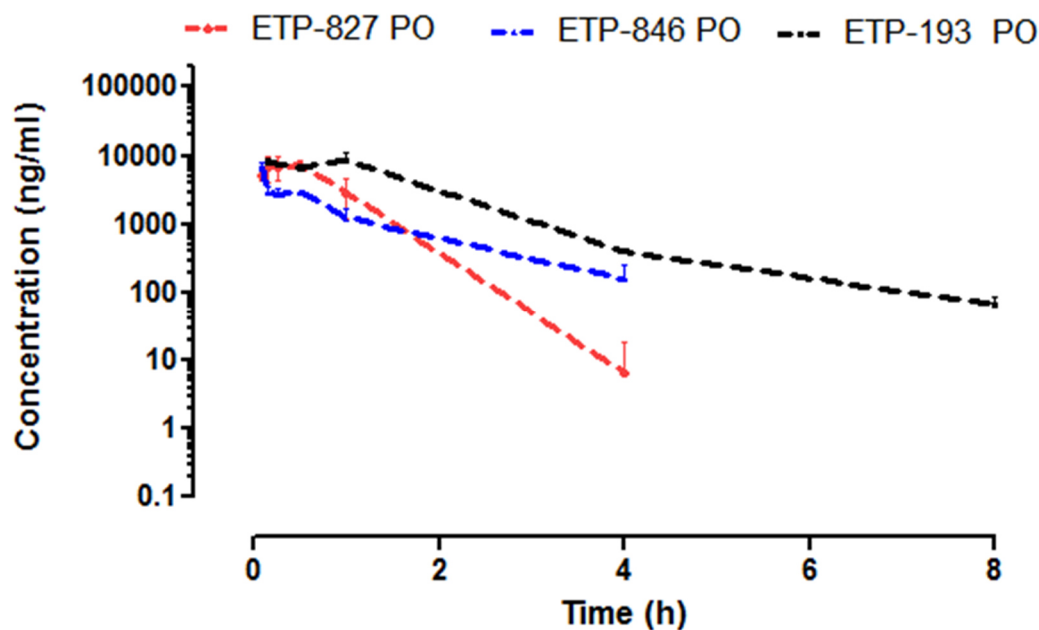
Inicialmente se seleccionaron 3 compuestos: ETP-827, ETP-846 y ETP-193. Los tres, potentes inhibidores de CDK8 y HASPIN, tanto a nivel bioquímico como celular; con buena solubilidad en medio acuoso y permeabilidad pasiva, buena estabilidad en microsomas humanos y de rata y estabilidad intermedia en ratón en los dos más potentes bioquímicamente, por lo que niveles menores de compuesto podrían ser suficiente para producir su efecto en el organismo sin potenciales problemas de cardiocitotoxicidad ni de interferencia con los CYP450 (Tabla 18).

El resto de análogos, si bien, en esta primera etapa no fueron seleccionados para progresar a estudios de PK, por mostrar un perfil ADME-T menos favorables, especialmente en estabilidad metabólica, podrían ser rescatados dependiendo de los resultados de la siguiente fase de optimización del candidato (LO).

Compuesto	ETP-827	ETP-846	ETP-193
Posición sustituida	R5	R5	R4
CDK8 IC ₅₀ (M)	5,13E-10	5,15E-10	2,09E-09
CDK19 IC ₅₀ (M)	7,43E-10	6,70E-10	2,88E-09
HASPIN IC ₅₀ (M)	2,06E-08	2,18E-08	1,07E-08
STAT1_SER727 EC ₅₀ (M)	1,73E-10	4,20E-08	1,55E-09
H3_THR3 EC ₅₀ (M)	1,60E-09	9,60E-08	5,22E-09
Ratio inhibición HASPIN vs CDK8	9,25	2,29	3,37
Solubilidad en PBS [μM]	100,00	100,00	100,00
Permeabilidad (PAMPA Pe 10-06 cm/s)	13,26	10,28	9,80
MS Humano (% compuesto recuperado)	95,55	76,00	104,93
MS Ratón (% compuesto recuperado)	39,90	53,00	85,48
MS Rata (% compuesto recuperado)	83,47	79,90	87,78
CYP1A2 IC ₅₀ (M)	2,71E-05	2,76E-05	>5,00E-05
CYP2C19 IC ₅₀ (M)	1,91E-05	1,59E-05	>5,00E-05
CYP2C9 IC ₅₀ (M)	9,16E-06	1,10E-05	>5,00E-05
CYP2D6 IC ₅₀ (M)	3,38E-05	>5,00E-05	>5,00E-05
CYP3A4 IC ₅₀ (M)	5,27E-07	3,93E-07	1,84E-06
hERG IC ₅₀ (M)	>30,00E-05	>30,00E-05	>30,00E-05

Tabla 18. Perfil de los compuestos seleccionados tras la fase de HtL.

De los tres compuestos seleccionados, se realizó una farmacocinética oral, para ver qué niveles se adquirirían en sangre tras administrar los compuestos a 10mg/kg (Fig. 63). El compuesto con mejores niveles y mayor vida media fue el ETP-193, el ETP-827 a pesar de tener una vida media más corta los valores de AUC eran mayores que los del ETP-846. Estos dos compuestos se progresaron a estudios de farmacodinámica y farmacocinética (PK/PD) para demostrar modulación de CDK8 en tumores y posteriormente a eficacia, resultados que no se muestran en este trabajo.



	ETP-827	ETP-846	ETP-193
C_{max} (ng/ml)	7793	4442.8	8706
T_{max} (h)	0.29	0.03	0.34
AUC	7124	3528	14693
T_{1/2} (h)	0.36	0.53	0.9

Figura 63. Niveles de compuesto en sangre tras administración vía oral a 10mg/kg en ratones Balbc de los compuestos líder de la fase de HtL y parámetros farmacocinéticos.

4.5. Optimización de los compuestos líderes o “Lead optimization” (LO).

En esta etapa del proceso del descubrimiento y desarrollo de fármacos, estudiamos, el rediseño de los análogos generados para mejorar la selectividad frente a HASPIN y obtener propiedades de la molécula que se ajustaran a un perfil farmacológico de pre-fármaco adecuado, compatibles con los sistemas biológicos para hacer estudios de PK/PD y posteriormente estudios de prueba de concepto *in vivo*.

En esta etapa, el objetivo principal fue diseñar nuevos análogos manteniendo las propiedades de potencia, selectividad frente a las diferentes CDKs, manteniendo las

propiedades ADME-T optimizadas (o en su defecto mejorarlas si procedía) y mejorar la selectividad frente a HASPIN. En total se generaron 46 nuevos análogos, introduciendo modificaciones en todas las posiciones preferentes identificadas en la fase de HtL y aplicando las relaciones estructura-afinidad establecidas, así se introdujeron modificaciones únicas o múltiples en las posiciones preferidas R4 y R5 (Fig. 64 y Tabla suplementaria 5).

Como era de esperar más del 80% de los análogos sintetizados presentaron una IC_{50} para CDK8 inferior a 100nM

Y el 40% de los compuestos activos, presentó un ratio de selectividad frente a HASPIN superior a 50. Los 9 compuestos con mejor ratio de selectividad, superior a 200, presentaron sustituciones en R4 y R5 (Figura 64B)

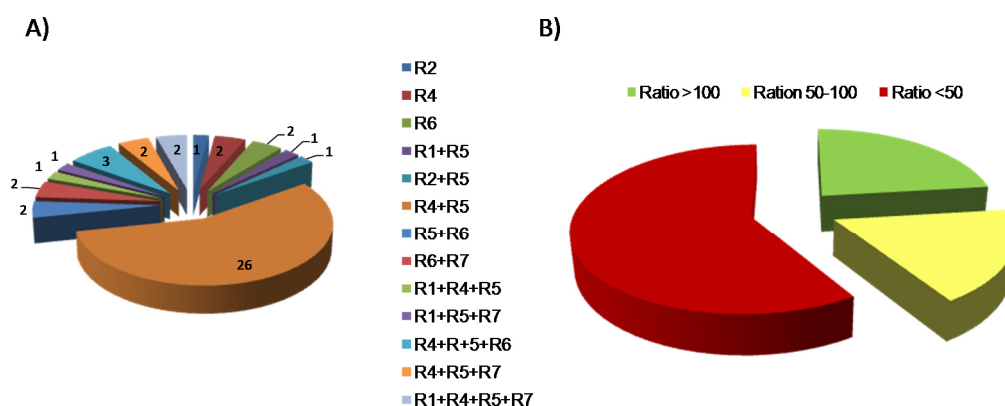


Figura 64. Análogos sintetizados en la fase de LO.

A) Agrupación según la posición sustituida. B) Ratio de selectividad HASPIN versus CDK8 a nivel bioquímico para los compuestos con una IC_{50} para CDK8 inferior a 100nM.

A continuación, se comprobó que los compuestos mantenían el ratio de selectividad a nivel celular y para ello se evaluó la modulación de los biomarcadores para cada diana de los compuestos con IC_{50} inferior a 10nM, al igual que se hizo en la fase de HtL. Los ratios de selectividad a nivel celular resultaron ser incluso mayores que a nivel bioquímico (Tabla 19).

Los 11 inhibidores con una ratio de selectividad entre las dos quinasas a nivel celular superior a 100 se perfilaron en primer lugar en microsomas, pues el objetivo de esta fase era identificar inhibidores de CDK8 selectivos para poder progresarlos a *in vivo*. Diez de los once análogos seleccionados presentaban sustituciones en R4 y R5 y el otro en R2 y R5. Cinco de los análogos presentaron una estabilidad en las 3 especies estudiadas suficiente para su priorización para una completa caracterización (Tabla 20, resaltados en azul oscuro).

Todos ellos fueron muy estables en microsomas humanos, con una estabilidad superior al 60% en ratón, siendo la estabilidad en rata la más baja.

Compuesto	Estructura (Sustitución)	CDK8 IC ₅₀ (M)	HASPIN IC ₅₀ (M)	STAT1_SER727 EC ₅₀ (M)	H3_THR3 EC ₅₀ (M)	Ratio selectividad HASPIN vs CDK8
ETP-230	R4	4.33E-09	3.45E-08	1.28E-09	3.00E-08	23.44
ETP-518	R4+R5	9.45E-09	4.76E-07	1.20E-08	1.52E-06	126.67
ETP-222	R4+R5	2.78E-10	1.25E-08	1.13E-09	4.20E-08	37.17
ETP-450	R4+R5	2.80E-10	1.79E-08	1.70E-10	3.98E-08	234.12
ETP-241	R4+R5	4.07E-10	9.52E-08	1.55E-10	3.30E-07	2129.03
ETP-523	R4+R5	1.41E-09	4.01E-08	1.00E-09	1.42E-07	142.00
ETP-324	R4+R5	5.70E-10	2.90E-07	6.40E-10	1.49E-06	2328.13
ETP-514	R4+R5	5.72E-10	1.03E-07	3.50E-10	9.48E-07	2708.57
ETP-357	R4+R5	8.96E-10	2.57E-08	9.00E-10	1.10E-08	12.22
ETP-242	R4+R5	1.15E-09	5.22E-07	5.81E-09	1.90E-08	3.27
ETP-487	R4+R5	1.19E-09	7.15E-07	1.10E-09	7.98E-06	7254.55
ETP-358	R4+R5	1.36E-09	7.49E-08	2.90E-09	2.73E-07	94.14
ETP-223	R4+R5	1.41E-09	4.21E-08	1.00E-11	4.40E-08	4400.00
ETP516	R4+R5	3.56E-09	5.78E-08	3.60E-08	1.88E-07	5.23
ETP-432	R4+R5	2.37E-09	1.56E-06	1.22E-07	1.03E-06	8.44
ETP-326	R4+R5	2.41E-09	2.34E-08	8.20E-09	6.80E-08	8.29
ETP-515	R4+R5	2.49E-09	7.14E-07	3.33E-09	3.47E-06	1042.04
ETP-524	R4+R5	2.58E-09	1.84E-07	8.00E-10	4.42E-07	552.50
ETP-325	R4+R5	3.33E-09	2.09E-06	5.00E-09	5.60E-07	112.00
ETP-449	R4+R5	3.41E-09	2.46E-07	5.10E-09	9.70E-08	19.02
ETP-517	R4+R5	4.46E-09	1.39E-06	9.00E-08	1.00E-05	111.11
ETP-430	R4+R5	4.50E-09	7.23E-07	1.15E-08	1.04E-06	90.43
ETP-474	R4+R5	5.18E-09	7.59E-08	2.10E-08	6.66E-07	31.71
ETP-289	R5+R6	2.02E-09	1.75E-08	1.20E-09	1.90E-08	15.83
ETP-480	R6+R7	1.18E-09	1.01E-08	3.53E-09	5.12E-09	1.45
ETP-496	R6+R7	1.90E-09	5.09E-09	9.00E-10	1.02E-08	11.33
ETP-328	R4+R5+R6	9.35E-09	7.35E-09	6.55E-07	1.00E-07	0.15
ETP-492	R4+R5+R6	1.41E-09	1.64E-08	3.30E-08	1.10E-07	3.33

Tabla 19. Modulación de los biomarcadores de CDK8 y HASPIN para los análogos con IC₅₀ para CDK8 inferior a 10nM sintetizados en la fase de LO.

Se resaltan en azul oscuro los compuestos más selectivos para CDK8 a nivel celular.

El resto de análogos con un perfil menos selectivo también se perfilaron en microsomas con el objetivo de identificar análogos con mejores propiedades de los compuestos líderes identificados en la fase de HtL. Los ETP-326, ETP-357 y ETP-358 fueron seleccionados por ser muy estables en las tres especies estudiadas (Tabla suplementaria 6).

Compuesto	Estructura (Sustitución)	CDK8 IC ₅₀ (M)	HASPIN IC ₅₀ (M)	MS humanos (% Compuesto remanente)	MS ratón (% Compuesto remanente)	MS rata (% Compuesto remanente)
ETP-241	R4+R5	4,07E-10	9,52E-08	18,80	4,90	11,25
ETP-324	R4+R5	5,70E-10	2,90E-07	79,95	88,00	41,65
ETP-514	R4+R5	5,72E-10	1,03E-07	98,85	80,55	34,10
ETP-487	R4+R5	1,19E-09	7,15E-07	31,20	13,15	0,00
ETP-223	R4+R5	1,41E-09	4,21E-08	46,12	53,23	28,68
ETP-515	R4+R5	2,49E-09	7,14E-07	92,45	79,15	34,15
ETP-524	R4+R5	2,58E-09	1,84E-07	61,80	13,20	36,95
ETP-518	R2+R5	9,45E-09	4,76E-07	116,50	63,25	64,20
ETP-523	R4+R5	1,41E-09	4,01E-08	87,45	22,20	26,65
ETP-325	R4+R5	3,33E-09	2,09E-06	154,60	63,85	42,25
ETP-517	R4+R5	4,46E-09	1,39E-06	3,45	38,65	3,60

Tabla 20. Perfil de estabilidad microsomal de los inhibidores de CDK8 con mejor ratio de selectividad frente a HASPIN.

Resaltados en azul oscuro los seleccionados para PK.

A continuación, se perfilaron en el panel de CDKs los análogos más o menos selectivos seleccionados en base a su estabilidad microsomal. Los 5 compuestos CDK8 selectivos fueron también muy selectivos frente al panel de CDKs, solo mostraron inhibición para CDK19 (Tabla suplementaria 7), resultado esperado, dada la alta homología entre CDK8 y CDK19. En el caso de los compuestos duales presentaron una alta selectividad para la mayoría de CDKs y solo en el caso de CDK5 y CDK9 se observaron ratios de selectividad algo más bajos, entre 30 y 100.

Compuesto	Ratio CDK1 vs CDK8	Ratio CDK2 vs CDK8	Ratio CDK4 vs CDK8	Ratio CDK5 vs CDK8	Ratio CDK6 vs CDK8	Ratio CDK7 vs CDK8	Ratio CDK9 vs CDK8
ETP-324	17544	17544	17544	9982	17544	17544	10000
ETP-514	17483	17483	17483	17483	17483	17483	8462
ETP-515	3209	1739	4016	4016	4016	269	494
ETP-518	531	1058	1058	1058	1058	1058	393
ETP-325	3003	3003	3003	1547	3003	1105	1063
ETP-326	436	212	788	70	1365	1506	37
ETP-357	761	408	11161	89	11161	4063	259
ETP-358	414	463	1897	122	7353	7353	179

Tabla 21. Ratios de selectividad para las diferentes CDKs versus CDK8 para los análogos seleccionados según su estabilidad metabólica.

En azul claro los compuestos más selectivos para CDK8 y en azul oscuro los compuestos más duales CDK8 / HASPIN.

Finalmente se completó el perfil ADME-T de estos 8 compuestos para priorizarlos para PK. Todos los compuestos presentaron una muy buena permeabilidad pasiva, en general una buena solubilidad superior a 100µM. Y también de forma general, no presentaron inhibiciones importantes de ninguno de los citocromos y tampoco mostraron una alerta de cardiotoxicidad (Tabla 22).

Compuesto	CDK8 IC ₅₀ (M)	Solubilidad en PBS [µM]	PAMPA (cm/seg 10E-6)	CYP1A2 IC ₅₀ (M)	CYP2C19 IC ₅₀ (M)	CYP2C9 IC ₅₀ (M)	CYP2D6 IC ₅₀ (M)	CYP3A4 IC ₅₀ (M)	hERG IC ₅₀ (M)
ETP-324	5,70E-10	100	10,49	>50,00E-05	2,71E-05	>50,00E-05	>50,00E-05	>50,00E-05	>30,00E-05
ETP-514	5,72E-10	100	9,82	2,85E-05	3,50E-07	1,94E-05	>50,00E-05	5,05E-06	7,81E-06
ETP-515	2,49E-09	100	11,7	>50,00E-05	>50,00E-05	7,89E-06	>50,00E-05	4,70E-06	>30,00E-05
ETP-518	9,45E-09	100	11,9	2,34E-06	>50,00E-05	>50,00E-05	>50,00E-05	>50,00E-05	>30,00E-05
ETP-325	3,33E-09	100	9,51	>50,00E-05	>50,00E-05	>50,00E-05	>50,00E-05	3,02E-06	20,70E-05
ETP-326	2,41E-09	100	4,33	>50,00E-05	>50,00E-05	>50,00E-05	>50,00E-05	1,77E-06	>30,00E-05
ETP-357	8,96E-10	10	13,96	>50,00E-05	2,06E-05	>50,00E-05	>50,00E-05	>50,00E-05	>30,00E-05
ETP-358	1,36E-09	50	5,21	>50,00E-05	>50,00E-05	>50,00E-05	>50,00E-05	>50,00E-05	>30,00E-05

Tabla 22. Propiedades físico químicas, inhibición de citocromos y hERG para los análogos seleccionados para PK.

En azul claro los compuestos más selectivos para CDK8 y en azul oscuro los compuestos más duales CDK8 / HASPIN.

Inicialmente se seleccionaron 3 compuestos de la Tabla 22 para su perfilado farmacocinético.

El ETP-518 y el ETP-324 como compuestos selectivos de CDK8 y el ETP-358 como un compuesto dual. Los 3 compuestos presentaron niveles aceptables en sangre aunque fueron inferiores a los obtenidos para el ETP-193 (Fig. 65). De manera, que el ETP-358 se decidió no progresarlo a estudios de PK/PD y de eficacia, pero se quedó como compuesto reserva del ETP-193. Y los compuestos selectivos ETP-518 y ETP-324 se decidió que avanzaran a estudios de PK/PD (experimentos que están en marcha).

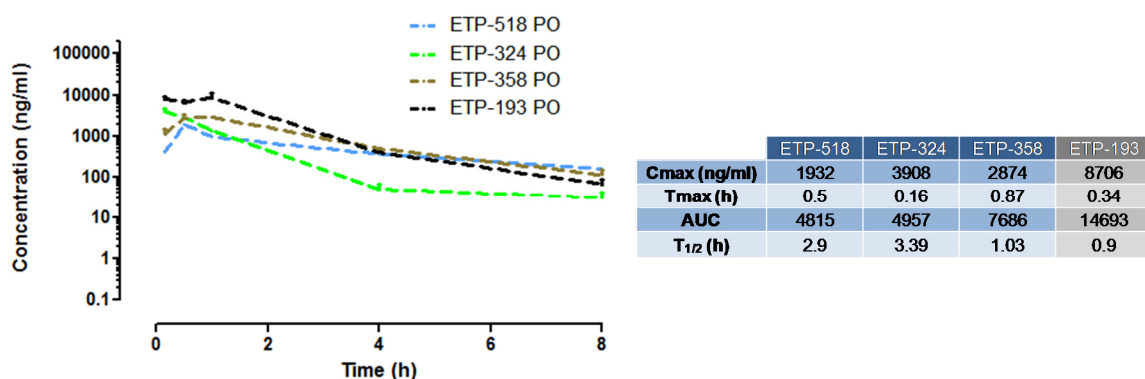


Figura 65. Niveles de compuesto en sangre tras la administración oral a 10mg/kg en ratones Balb/c de los compuestos líder de la fase de LO y comparativa con el mejor compuesto obtenido en la fase de HtL.

4.6. Caracterización de la cinética de unión de los inhibidores pre-seleccionados con propiedades pre-fármacos.

Los compuestos más avanzados fueron seleccionados para la realización de los estudios de cinética de unión y la determinación de las constantes k_{off} / k_{on} y el tiempo de residencia (parámetros descritos en la introducción apartado 1.4.6.1)

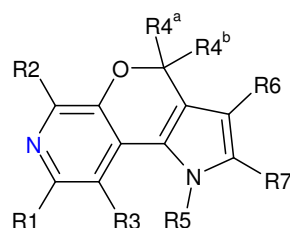
Para ello se plantearon diversos experimentos de cinética de unión con los inhibidores tal como han sido descritos en el apartado 3.1.1 de M&M, al objeto de caracterizar el perfil en términos de tiempo de residencia o *vida* media disociativa $t_{1/2}$ de cada inhibidor y aportar información complementaria al perfil para su progresión teniendo en cuenta como criterio favorable los tiempos de residencia más prolongados relacionados con una mayor eficacia terapéutica *in vivo* [242].

Los compuestos líderes identificados tras la fase de HtL, ETP-827 y ETP-193 y dos de los compuestos que se priorizaron para PK tras la fase de LO, ETP-518 y ETP-358, así como el ETP-289 sintetizado en la fase de LO, no priorizado para PK, pero con un patrón de sustitución diferente, fueron seleccionados para el estudio de cinética de unión. A su vez, se escogieron dos inhibidores de CDK8 publicados en la literatura, CCT152545 y Senexina B para

realizar un estudio comparativo con respecto a los análogos desarrollados en el programa de ETP (Fig. 66).

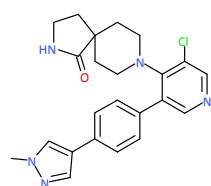
En un primer experimento se determinaron la afinidad (K_d) y potencia (K_i , IC_{50}) de los inhibidores. En un segundo experimento, se diseñó un ensayo para identificar inhibidores con cinética de asociación rápida o lenta en la formación del complejo RL. Los inhibidores de asociación lenta suelen ser inhibidores de unión fuerte y sus valores de la IC_{50} dependientes de la concentración de enzima [237]. Por último, en un tercer experimento se determinaron las constantes de velocidad de asociación y disociación del complejo binario Enzima-Inhibidor [EI] y el tiempo de residencia y se estudiaron los diferentes comportamientos en la cinética de interacción Enzima-Inhibidor [EI] en relación a las sustituciones introducidas a partir del farmacóforo del compuesto ETP-749.

A)

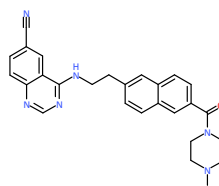


	Sustituciones
ETP-749	Todas las R fueron H, menos R7 común a todos los compuestos
ETP-827	R5 diferente de H, R7 común a todos los compuestos
ETP-193	R4 y R5 diferente de H, R7 común a todos los compuestos
ETP-518	R2 y R5 diferente de H, R7 común a todos los compuestos
ETP-358	R4 y R5 diferente de H, R7 común a todos los compuestos
ETP-289	R6 diferente de H, R7 común a todos los compuestos

B)



CCT251545



Senexin B

Figura 66. Compuestos seleccionados para la caracterización cinética de unión.

A) Estructura del farmacóforo del compuesto ETP-749, del que derivan los 4 análogos estudiados y tabla con las sustituciones de cada compuesto. B) Estructura de los compuestos de referencia CCT251545 y Senexina B [124].

Los experimentos fueron realizados con el método de desplazamiento de reportero y el método de “dilución rápida” [266][251], empleando la tecnología de “*LanthaScreen Eu Kinase Binding Assay*” en las condiciones de ensayo descritas en M&M apartado 3.1.1.

Como se puede observar en las Tablas 23, a partir de los datos generados con los ensayos a tiempo final y sin preincubación (M&M apartado 3.1.1), cuatro de los 6 compuestos seleccionados presentaron actividad dual CDK8 / HASPIN, sin embargo el ETP-518 mostró mayor selectividad frente a HASPIN tanto a nivel celular como bioquímico, así como el ETP-358 pero en menor grado. Los inhibidores de referencia también eran selectivos frente a HASPIN:

Compuesto	Fase de selección	Posición sustituida	CDK8 IC ₅₀ (M)	CDK19 IC ₅₀ (M)	HASPIN IC ₅₀ (M)	STAT1_SER727 EC ₅₀ (M)	H3_THR3 EC ₅₀ (M)
ETP-749	HG	Ninguna	2.50E-09	1.3E-08	4.3E-08	1.80E-09	9.90E-09
ETP-827	HtL	R5	4.90E-10	7.43E-10	2.06E-08	1.73E-10	1.6E-09
ETP-193	HtL	R4	2.09E-09	2.88E-09	1.09E-08	1.55E-09	5.29E-09
ETP-289	LO	R6	2.02E-09	4.02E-09	1.75E-08	1.20E-09	1.90E-08
ETP-518	LO	R2+R5	9.45E-09	9.58E-09	4.76E-07	1.20E-08	1.52E-06
ETP-358	LO	R4+R5	1.36E-09	1.81E-09	7.49E-08	2.90E-09	2.73E-07
Senexina B	Referencia	Referencia	2.11E-08	4.10E-08	3.70E-05	5.52E-08	7.37E-06
CCT251545	Referencia	Referencia	1.0E-09	2.85E-09	1.00E-05	2.57E-09	1.00E-05

Tabla 23. Perfil bioquímico y celular de los compuestos seleccionados para el estudio cinético.

4.6.1. Identificación de inhibidores según su cinetica de asociación “rápida o lenta”.

Para identificar si los inhibidores se ajustan a un modelo asociación “rápida o lenta” en la interacción con CDK8 [273][265], se estudió la variación de los valores obtenidos de IC₅₀ en dos intervalos de tiempo de incubación de 20 y 60 minutos (sin la preincubación del complejo [EI]). Este experimento nos daba idea de si el equilibrio entre las formas libres [E] e [I] y la forma asociada [EI] se establecía de forma rápida o lenta [237].

Así, compuestos que mostraran el mismo valor de IC_{50} en ambas mediciones en los intervalos de tiempo establecidos, podían aproximarse a una cinética de asociación o unión “rápida” en la formación del complejo [EI]. Sin embargo, compuestos con diferentes valores de IC_{50} respecto a los dos intervalos de tiempo, describirían una cinética de unión más lenta, ya que la unión del complejo [EI] en el intervalo de tiempo corto (20 minutos) no sería completa y no alcanzaría totalmente el equilibrio.

Los inhibidores con cinéticas de unión “lenta” suelen presentar tiempos de residencias más largos y suelen ser inhibidores de unión fuerte o *tight binding* que mantienen una relación estequiométrica 1:1 con la enzima y se caracterizan por ser inhibidores “enzima-dependientes” [237]. Las condiciones experimentales se recogen en el apartado 3.1.1 de M&M y la Fig. 32.

En las gráficas de la Figura 67A, se muestran las curvas de inhibición de los 6 compuestos avanzados donde se puede observar que prácticamente existe un solapamiento de las curvas de inhibición en los dos intervalos de tiempo estudiados y los valores de IC_{50} son prácticamente los mismos para los dos intervalos de tiempo (Fig. 73)

En el caso del análogo ETP-289 observamos que las curvas de inhibición no llegan a solaparse completamente y por tanto la asociación del complejo [EI] era ligeramente más lenta. El valor de IC_{50} era en torno a 2.5 veces menor a 60 minutos respecto al valor a 20 minutos.

En la Figura 67 B y C, están representadas las curvas de inhibición de los compuestos de referencia CCT251545 y Senexina B y sus valores de IC_{50} . El CCT251545 presentó un perfil de las curvas de inhibición similar al ETP-289. La IC_{50} a 60 minutos presentó una ligera disminución respecto al valor de la IC_{50} a 20 minutos. Respecto a la Senexina B, mostró un claro solapamiento de las curvas de inhibición y la diferencia observada de la IC_{50} en los dos intervalos de tiempo no era significativa.

La interpretación de estos resultados nos indicaría que nuestros inhibidores se ajustaban a un modelo de asociación “rápida” con alta afinidad por CDK8.

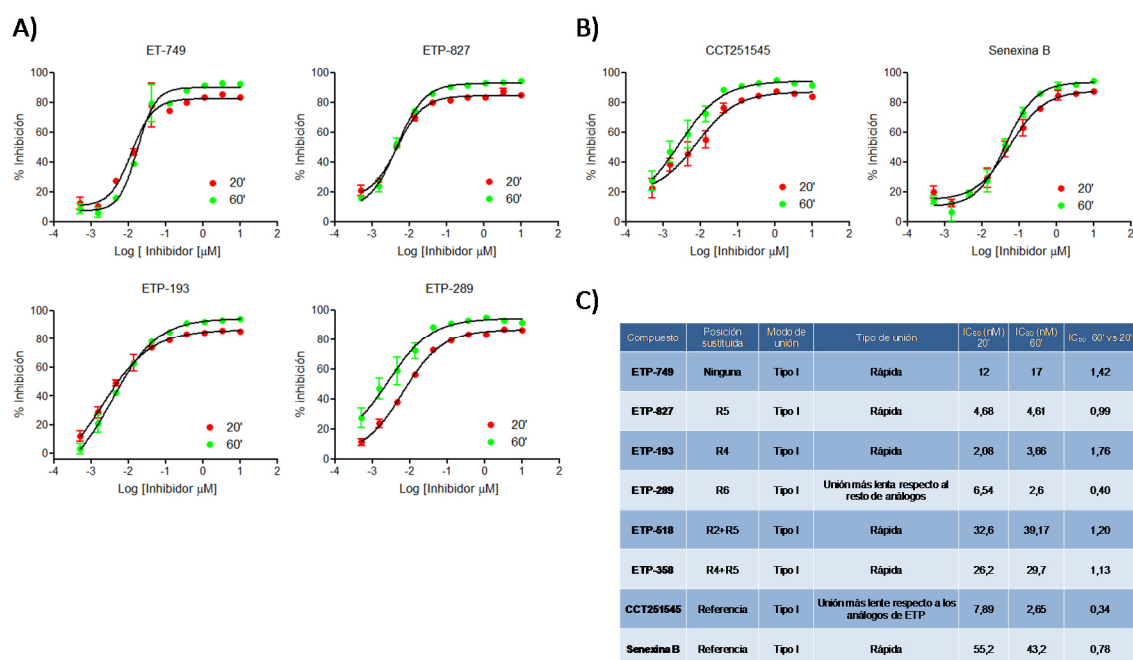


Figura 67-. Curvas dosis-respuesta a 20 y 60 minutos de incubación.

A) Curvas de dosis-respuesta de los 6 inhibidores seleccionados después de las fases de HtL y LO. B) Curvas dosis-respuesta de los inhibidores de referencia CCT251545 y Senexina B. C) Tabla resumen con los valores estimados de IC₅₀ para los intervalos de tiempo estudiados.

4.6.2. Determinación de las constantes K_i y K_d de los inhibidores con perfil farmacológico avanzado.

Aunque ya disponíamos de valores de IC₅₀ para todos los compuestos, estos habían sido generados sin preincubar la enzima con el inhibidor, y dado que en los estudios cinéticos se realiza esta preincubación decidimos generar de nuevo los datos en estas condiciones de ensayo.

Así, para permitir la formación del complejo EI previa al desplazamiento por el trazador se preincubó CDK8 con diferentes concentraciones de inhibidor durante 60 minutos (partiendo de una concentración de 10μM en diluciones al 1/3, 9 concentraciones por duplicado) en las condiciones de ensayo descritas en el apartado 3.1.1 de M&M (Fig. 32). Se leyó el ensayo en modo de lectura continua, aunque para los cálculos solo se consideraron las lecturas al tiempo

de 60 minutos. Los datos obtenidos se normalizaron con los controles sin inhibidor como control negativo y en ausencia de proteína CDK8 como control positivo.

Los datos brutos fueron analizados ajustándolos a un modelo sigmoideo de regresión no lineal de dosis-respuesta para obtener las diferentes curvas de desplazamiento y determinar los valores experimentales de IC_{50} aplicando la Ecuación 5 descrita en el apartado 3.1.5.2 de M&M. Aplicando la Ecuación 6 se determinó la K_i a partir de la IC_{50} experimental. Para el cálculo de la K_d se ajustaron los datos a una regresión no lineal, “*one site specific binding*” y se aplicó la Ecuación 7 descrita en el apartado 3.1.5.2 de M&M.

Los valores obtenidos K_i se tuvieron en cuenta para la establecer la concentración empleada en el estudio de cinética de unión y los valores obtenidos de K_d para la determinación de la tasa de las constantes k_{off} / k_{on} .

Compuesto	Posición sustituida	K_i (nM)	K_d (nM)
ETP-749	Ninguna	7,20	18,10 ± 0,9
ETP-827	R5	1,25 ± 0,0	3,9 ± 0,9
ETP-193	R4	6,70 ± 0,1	9,9 ± 0,6
ETP-289	R5+R6	1,40 ± 0,4	4,4 ± 0,2
ETP-518	R2+R5	2,03 ± 0,6	4,93 ± 0,10
ETP-358	R4+R5	16,37	29,54
CCT251545	Referencia	1,10 ± 0,9	2,75 ± 1,3
Senexina B	Referencia	18,22	44,49

Tabla 24. Valores de K_d y K_i obtenidos en el ensayo con preincubación enzima y inhibidor con lectura continua.

Los valores corresponden a un tiempo elegido de 60 minutos. Los datos corresponden a la media de dos experimentos y su desviación estándar.

4.6.3. Determinación de las constantes de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) y el tiempo de residencia ($t_{1/2}$).

El estudio para la determinación de las constantes de asociación, disociación y tiempo de residencia fue realizado en las condiciones experimentales descritas en el apartado 3.1.1 de

M&M (Fig. 32), aplicando el método de dilución rápida[266] [273][274]. Para el análisis de los datos fueron aplicados los modelos y las ecuaciones descritos en el apartado 3.1.5.2. de M&M, que describe la metodología empleada asumiendo un mecanismo simple de un solo paso (mecanismo elemental, donde las constantes microscópicas de equilibrio, $k_1 = k_{on}$ y $k_2 = k_{off}$).

Por otra parte existe una interrelación directa de K_d con respecto a las constantes k_{off} / k_{on} , pues la $K_d = k_{off} / k_{on}$ [275].

En la Fig. 74 se representan las curvas de progresión de la disociación del complejo preformado [EI] en función del tiempo, donde se pudo observar un aumento progresivo de la señal de fluorescencia (*TR-FRET*), por asociación del trazador 236 (o desplazamiento del inhibidor) hasta alcanzar el equilibrio y la estabilización de la señal máxima. En cada gráfica se representó la curva de disociación del inhibidor, a la concentración ensayada que correspondía a su K_i (azul), la curva del control sin inhibidor (roja) y la curva del control sin enzima (negra). Bajo estas condiciones experimentales, la enzima se encuentra saturada entorno al 98-100% formando el complejo binario [EI]. Al ser diluida rápidamente con trazador ($10 \times K_d$), el complejo era desplazado por el trazador hasta alcanzar la saturación [EL], momento en el que toda la enzima estaba ocupada por el trazador y la velocidad de asociación era máxima. La representación gráfica de los diferentes inhibidores (Fig. 68) describió perfiles de disociación ligeramente diferenciados y refirieron tiempos de residencias medios y “cortos” con diferencias no significativas entre los análogos, excepto el ETP-193.

La Tabla 25 resume los valores de los parámetros cinéticos determinados, estimados junto con los valores de K_d , de las 6 moléculas avanzadas y los inhibidores de referencia. El ETP-193, compuesto dual CDK9/HASPIN, presentó el tiempo de residencia más prolongado (36 minutos) y por tanto la k_{off} más baja del grupo de análogos, es decir, el compuesto con menor velocidad de disociación del complejo [EI]. El tiempo de residencia y por tanto la k_{off} del ETP-193 fue 3 veces superior a los valores del cabeza de serie, ETP-749. Mientras, que el

inhibidor selectivo de CDK8, ETP-518, presentó un tiempo de residencia de 13 minutos similar al del cabeza de serie.

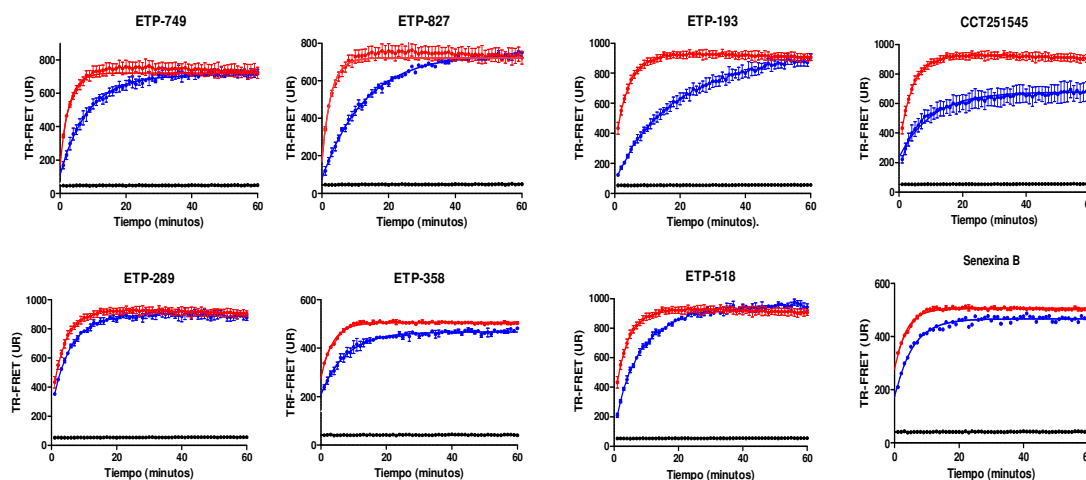


Figura 68. Representación de las curvas de desplazamiento del complejo enzima-inhibidor.

Las curvas representan el desplazamiento de los inhibidores por el trazador y la recuperación de la señal de señal TR-FRET en función del tiempo. En el eje de ordenadas se representa los valores de la señal de TR-FRET normalizada y en el eje de abscisas el tiempo. La curva roja representa el control negativo sin inhibidor, la azul con inhibidor y la negra control positivo sin enzima. El experimento se realizó por duplicado, se representan curvas representativas de uno de los dos experimentos.

El ETP-289, el análogo más singular del grupo, presentó el tiempo de residencia más bajo respecto al conjunto de los análogos (≤ 10 minutos) y la k_{off} más alta (disociación rápida). El resto de los análogos, ETP-827 y ETP-358, con tiempos de residencia similares, mejoraron ligeramente el valor de tiempo de residencia respecto al cabeza de serie.

Por otra parte, el inhibidor de referencia CCT251545 presentó un tiempo de residencia de 54 minutos, el más prolongado respecto al conjunto de los análogos desarrollados por ETP, dato que correlacionó con los datos reportados en la literatura [95]. El otro inhibidor de referencia, Senexina B, mostró un tiempo de residencia similar a los compuestos ETP-749 y 518.

Estos resultados nos indicaron que la optimización de los compuestos análogos estudiados no dio lugar a una mejoría significativa del tiempo de residencia. El único análogo

que mostró un tiempo de residencia optimizado fue el ETP-193, multiplicando por tres el tiempo de residencia del compuesto cabeza de serie ETP-749.

Compuesto	K_d (M)	k_{off} (min ⁻¹)	k_{on} (M ⁻¹ . min ⁻¹)	($T_R=1/k_{off}$) min)
ETP-749	1.81E-08	8.43E-02	4.66E+06	12
ETP-827	3.87E-09	4.33E-02	1.12E+07	17
ETP-193	9.9E-09	2.77E-02	2.80E+06	36
ETP-289	4.4E-09	1.49E-01	3.38E+07	7
ETP-518	4.93E-08	7.76E-02	1.58E+06	13
ETP-358	2.95E-08	5.82E-02	1.94E+06	17
CCT251545	2.75E-09	2.17E-02	7.88E+06	54
Senexina B	4.44E-08	7.51E-02	1.69E+06	13

Tabla 25. Relación de los valores estimados de las constantes cinéticas. k_{off} , K_{on} y tiempos de residencia determinadas para las moléculas avanzadas y los inhibidores de referencia.

Se representó la k_{on} frente a la k_{off} para establecer la relación entre ellas (Fig. 69A). Así, el compuesto de referencia CCT251545 presentó una relación concordante ya que mostró una k_{on} alta y a su vez una k_{off} baja. Sin embargo, inhibidores como el ETP- 289 presentaron una relación k_{on}/k_{off} , discordante, con valores altos para ambas constantes. Por su parte, el ETP-193 con la k_{off} más baja mostró una k_{on} con un valor intermedio respecto al conjunto de análogos.

Si bien se esperaría que inhibidores con alta afinidad, deberían presentar una k_{on} alta y k_{off} baja, no siempre es de este modo. Estas constantes dependen de factores diferentes, así la k_{on} depende de la concentración del inhibidor y de factores farmacológicos asociados (absorción, distribución en tejidos), mientras que la k_{off} depende totalmente de interacciones específicas (tales como, cambios conformacionales de la proteína, fuerzas no polares, e interacciones Van der Waals, unión a hidrógeno,) entre el complejo enzima - inhibidor [242] [241][243] [276][235].

En la Fig. 69B se representó la correlación existente entre los valores observados de tiempo de residencia y la K_d para el conjunto de los análogos y los compuestos de referencia. De los resultados se desprendió que mayoritariamente los análogos presentaron una K_d baja (alta afinidad) y tiempos de residencia “cortos”, a excepción del ETP-193 que presentó un tiempo de residencia por encima de la media del conjunto. Algunos autores postulan que a mayor afinidad de un inhibidor por su diana, mayor podría ser el tiempo de residencia o tiempo de interacción EI. Pero no todos los inhibidores mostraron una correlación entre estos dos parámetros. Así, el ETP-289 con una K_d similar al ETP-827 y al ETP-518 presentó un tiempo de residencia más bajo (Fig. 69B). Sin embargo, para el CCT251545, con una estructura totalmente diferente a nuestros análogos, si se observó correlación entre estos dos parámetros y se ajustaría a la hipótesis de que inhibidores con alta afinidad por el receptor presentan tiempos de residencia más prolongados, aunque cabe recordar que en cualquier caso los tiempos de residencia observados fueron relativamente cortos.

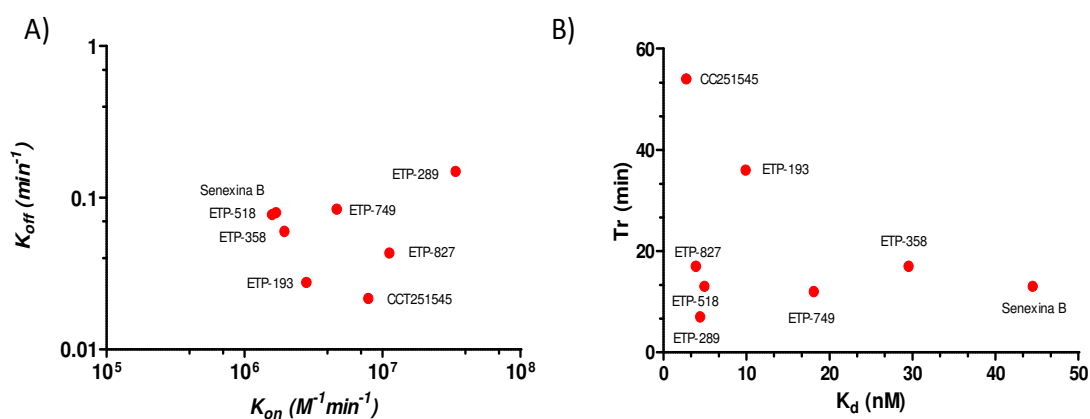


Figura 69. Relaciones entre los parámetros cinéticos k_{off} , k_{on} y K_d

A) Relación entre los valores de k_{off} y k_{on} del conjunto de los análogos desarrollados por ETP y los inhibidores de referencia. B) Representación gráfica de la correlación entre los valores de K_d y el tiempo de residencia de los inhibidores.

4.7. Estudio de la estabilidad de los inhibidores en las condiciones experimentales empleadas.

Los datos aportados de las constantes cinéticas fueron determinados en un tiempo de ensayo de 60 minutos. No obstante, todos los experimentos diseñados en modo cinético fueron inicialmente planteados en un tiempo máximo de 300 minutos, en lecturas continuas, en intervalos de un minuto de exposición con luz laser (excitación con laser a una longitud de onda de 320nm según protocolo de lectura del lector de placas Envision).

En las condiciones descritas anteriormente, fueron procesados los resultados del experimento descrito en el apartado 5.6.1 de resultados y se determinaron los valores estimados de IC_{50} a diferentes tiempos (10, 30, 60, 100, 150, 200 y 300 minutos). El análisis de los valores estimados de la IC_{50} y la representación gráfica de las curvas de inhibición (Fig. 70) nos indicó que los compuestos ETP-749, ETP-827, ETP-193, ETP-518 y ETP-358 presentaban una disminución muy significativa de la potencia observada a partir de los 60 minutos del inicio de la cinética, con pérdidas de potencia de forma significativa en los tiempos largos de lectura continu. Sin embargo, esta pérdida de potencia no fue observada en los compuestos de referencia CCT251545, Senexina B y el análogo ETP-289.

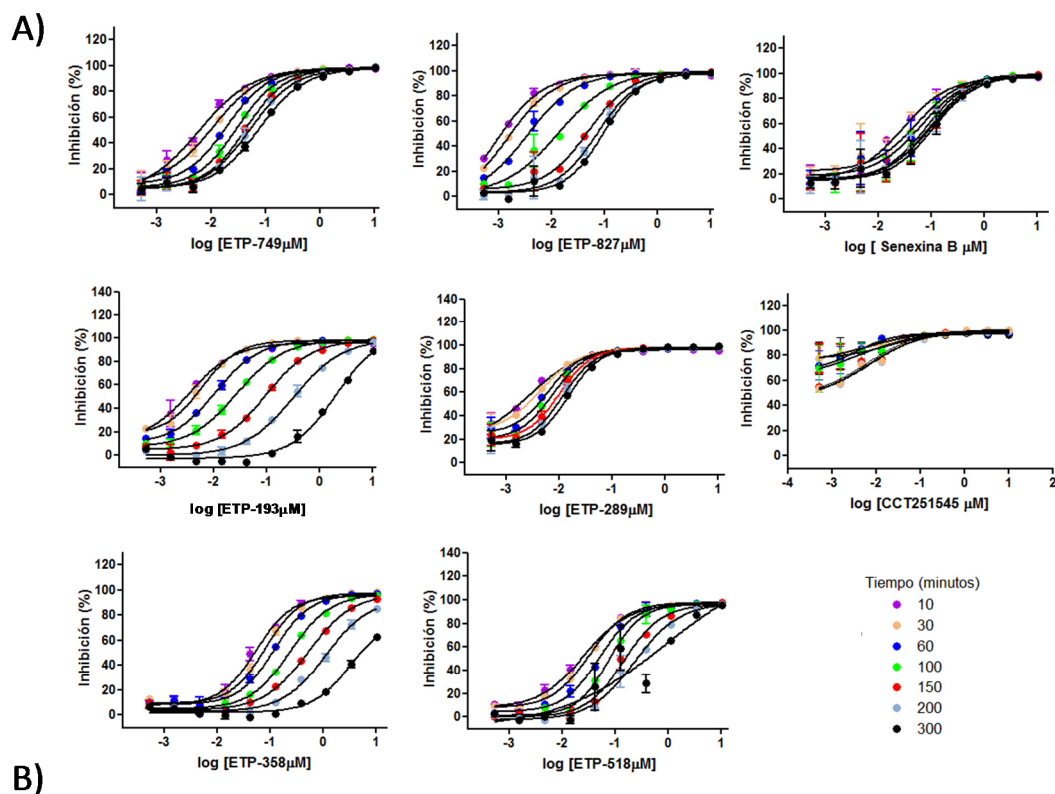


Figura 70. Evolución temporal de la IC₅₀ desde 10 hasta 300 minutos.

A) Curvas de dosis-respuesta de los 6 análogos y los compuestos de referencia en función del tiempo. B) Tabla con los valores de IC₅₀ (nM) a lo largo del tiempo.

Tal comportamiento nos indujo a pensar que los compuestos podrían presentar inestabilidad química a la irradiación y que probablemente se estaban degradando lo que justificaría la pérdida de potencia en función del tiempo. Para probar esta hipótesis, se realizó un análisis cualitativo por LC/MS/MS de los compuestos ETP-193 y ETP-289. Se analizaron las muestras a tiempos de 0, 2 y 5 horas con tratamiento de exposición a luz láser en las mismas condiciones de ensayo y en paralelo se analizaron controles de los mismos compuestos sin exposición a luz láser. Los perfiles de los espectros de LC/MS/MS de cada uno de los compuestos se recogen en la Fig. 71. El perfil del cromatograma de masas del compuesto ETP-

193 indicó que se detectan dos picos con tiempos de retención diferentes, uno de ellos con tiempo de retención (3.9) que corresponde al compuesto ETP-193 inicial (flecha verde), y otro pico con un tiempo de retención diferente (3.8) (flecha roja), aunque con la misma masa, que se detecta a las 2h y se convierte totalmente en este a las 5h. Esto indicaría que posiblemente el compuesto se está transformando químicamente lo cual explicaría la pérdida de afinidad y por tanto de potencia observada en el curso del tiempo. (Fig. 70). En el caso del ETP-289 en el perfil del cromatograma se observa un solo pico con el tiempo de retención que corresponde al compuesto referido desde un inicio sin excitación con el láser (Figura 71A). De este análisis se concluyó que posiblemente 5 de los 6 análogos presentaban fotosensibilidad en disolución, pero no en polvo seco. El compuesto ETP-289 presenta una sustitución en la posición R3, que no presentan el resto de los 5 análogos, y se podría pensar que este grupo protege de la fotodegradación.

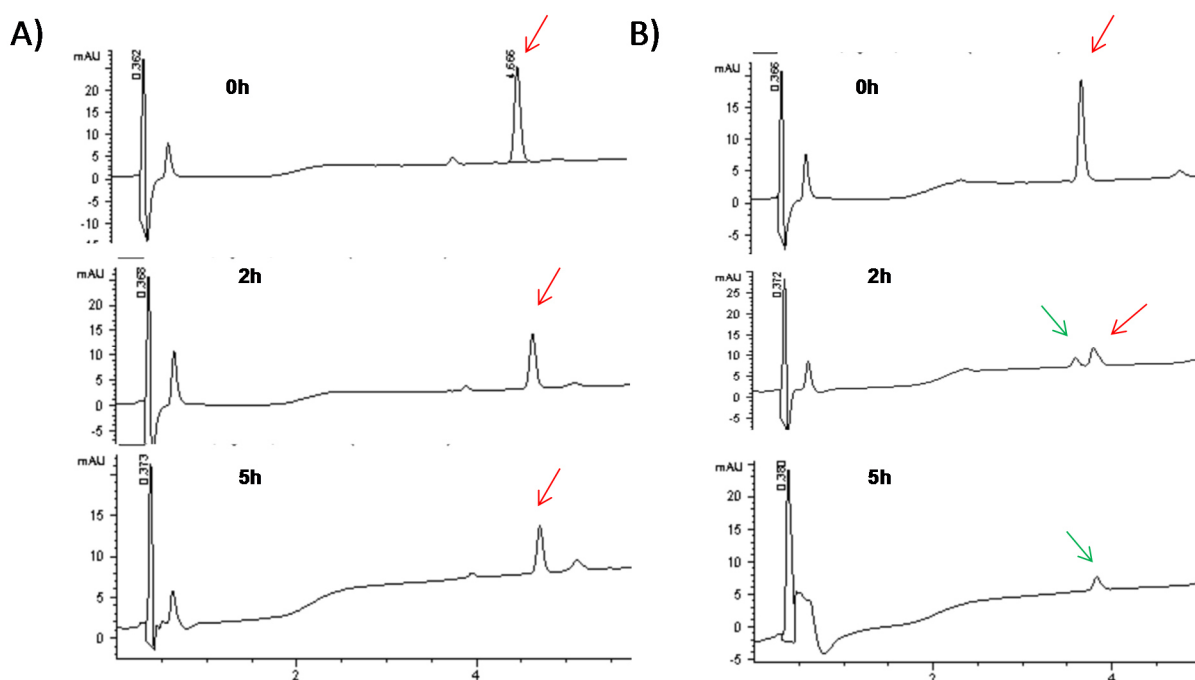


Figura 71. Cromatogramas del análisis cualitativo por LC-MS/MS realizado con los inhibidores ETP-193 y ETP-289 con tratamiento láser a tiempo 0, 2 y 5 horas.

Esta propiedad detectada (fotosensibilidad) condicionó las condiciones experimentales. En particular, el tiempo de monitorización del ensayo para la determinación de los parámetros cinéticos k_{off} y k_{on} que se redujo a un máximo de 60 minutos como se ha expuesto en resultados anteriores.

4.8. Estudio comparativo de los 3 compuestos líder respecto a los inhibidores de referencia Senexina B y CCT251545

Al comparar los datos de potencia frente a CDK8, CDK19, HASPIN y la modulación de los biomarcadores STAT1-Ser727 y H3-Thr3 de los tres compuestos análogos seleccionados con propiedades pre-fármaco y los inhibidores de referencia CCT251545 y Senexina B se observó que los compuestos ETP-827 y ETP-193 eran compuestos duales CDK8 / CDK19 y HASPIN tanto a nivel bioquímico como celular, mientras que el análogo ETP-518 era un compuesto con selectividad intermedia frente a HASPIN (en torno a dos órdenes de magnitud) (Tabla 26). En cuanto a los inhibidores de referencia CCT251545 y Senexina B, su potencia frente a CDK8 y CDK19 se correspondió con los datos reportados y presentaron alta selectividad frente a HASPIN [124] [127].

Compuesto	Fase de selección	Posición sustituida	CDK8 IC ₅₀ (M)	CDK19 IC ₅₀ (M)	HASPIN IC ₅₀ (M)	STAT1_SER727 EC ₅₀ (M)	H3_THR3 EC ₅₀ (M)
ETP-827	HtL	R5	4,90E-10	7,43E-10	2,06E-08	1,73E-10	1,6E-09
ETP-193	HtL	R4	2,09E-09	2,88E-09	1,09E-08	1,55E-09	5,29E-09
ETP-518	LO	R2+R5	9,45E-09	9,58E-09	4,76E-07	1,20E-08	1,52E-06
Senexina B	Referencia	Referencia	2,11E-08	4,10E-08	3,70E-05	5,52E-08	7,37E-06
CCT251545	Referencia	Referencia	1,0E-09	2,85E-09	1,00E-05	2,57E-09	1,00E-05

Tabla 26. Caracterización bioquímica y celular de los compuestos más avanzados desarrollados por ETP y los inhibidores de referencia.

Valores promedio de las IC₅₀ frente a CDK8, CDK19, HASPIN y de EC₅₀ para la modulación de los biomarcadores STAT1-Ser727 y H3-Thr3.

Como se puede observar en la Tabla 27, los análogos seleccionados en general mostraron alta selectividad a nivel bioquímico para el conjunto de las isoformas de CDKs. No

obstante, el ETP-827 y el ETP-193 presentaron una selectividad media frente a CDK9, con un factor de selectividad inferior a 100. Aunque, la modulación de la Ser2 de la ARN polimerasa II por parte de CDK9 en células reportó una selectividad de 8000 veces para ambos inhibidores. A su vez, el ETP-193 también presentó menor selectividad frente a CDK5 (factor de selectividad 107). Por su parte, los compuestos de referencia fueron muy selectivos para todo el conjunto de las isoformas de CDKs, con factor de selectividad ≥ 10000 .

Selectividad vs CDK8	ETP-827	ETP-193	ETP-518	CCT251545	Senexin B
CDK1	1376	271	750	>10000	>10000
CDK2	1801	718	1058	>10000	>10000
CDK4	20121	4785	1058	>10000	>10000
CDK5	795	107	1058	5730	>10000
CDK6	7425	4795	1058	>10000	>10000
CDK7	6600	1923	1058	>10000	>10000
CDK9	72	61	381	2060	>10000

Tabla 27. Relación del factor de selectividad respecto a la IC₅₀ de CDK8 de las diferentes isoformas de CDKs para las moléculas avanzadas y los inhibidores de referencia.

Para comprobar si los diferentes perfiles de los compuestos podían tener un efecto en su actividad antiproliferativa, se realizó un ensayo de viabilidad celular preliminar usando 4 líneas celulares. Estas líneas fueron seleccionadas de un panel de 40 líneas celulares en las que previamente se había testado el ETP-827, donde se incluyeron dos líneas de leucemia mieloide aguda (MV4-11 y MOLM13), una línea de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231) y una línea de cáncer de colon (SW620). Los inhibidores ETP-827 y ETP-193 presentaron una actividad antiproliferativa mayor para las 4 líneas celulares estudiadas (valores del 50% de inhibición del crecimiento, GI₅₀, inferiores a 10 μ M para todas las líneas), mostrando especial sensibilidad las líneas de leucemia con valores de GI₅₀ inferiores 1 μ M (Fig.72). En el caso de los inhibidores más selectivos para CDK8, como el ETP-518 y los inhibidores de referencia, se

observó que solo en el caso de las líneas de leucemia la GI_{50} estaba por debajo de $10\mu M$, y la respuesta observada para la línea de cáncer de mama y de colon fue en la mayoría de los casos superior a $50\mu M$.

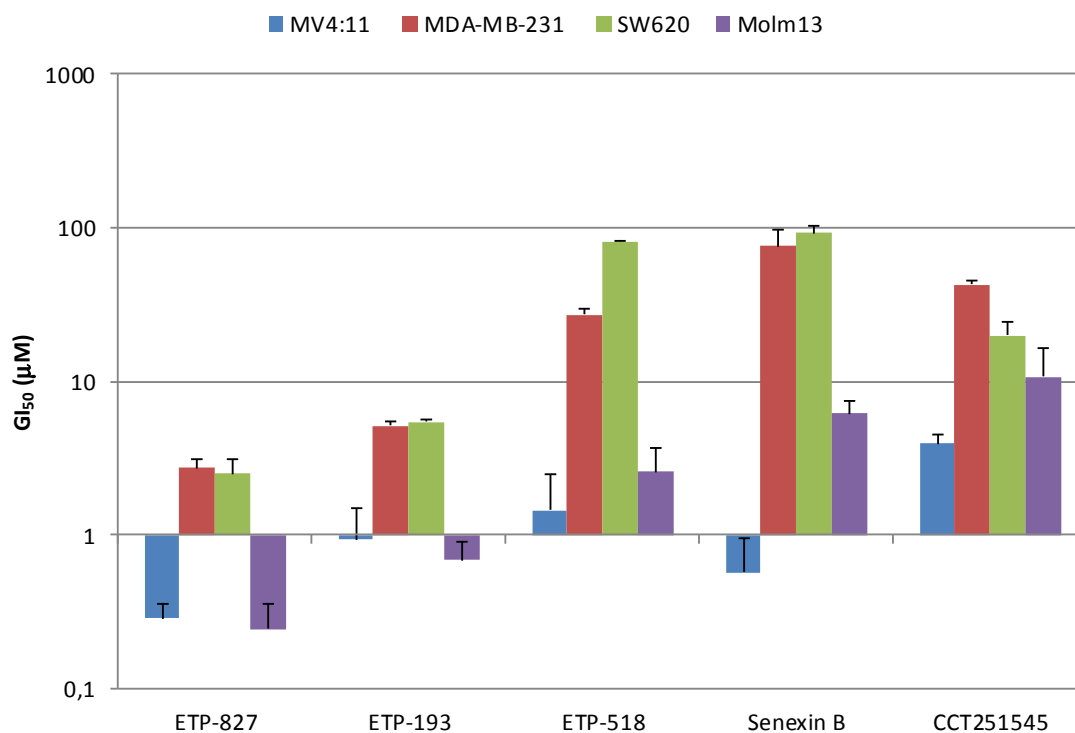


Figura 72. Efecto antiproliferativo en 4 líneas celulares tras 72h de tratamiento. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se representa la media y la desviación estándar.

Dada la diferente actividad antiproliferativa de los diferentes inhibidores, se realizó un análisis cuantitativo monoparamétrico del contenido de ADN mediante citometría de flujo para establecer en qué fase del ciclo celular estaban actuando los inhibidores y ver preliminarmente si estaban induciendo apoptosis. El tratamiento se realizó a diferentes concentraciones de inhibidor ($2,5$ y $0,5\mu M$) en la línea tumoral MOLM13, una de las líneas sensibles para todos los inhibidores, por un período de 24h.

Como se puede observar en la Figura 73, los inhibidores ETP-827 y ETP-193 tanto a $2,5$ como a $0,5\mu M$ indujeron apoptosis, siendo el efecto dosis dependiente (población SubG1 del 54.4 y 39.9% respectivamente a una concentración de $2.5\mu M$ de inhibidor). Por otra parte,

el inhibidor ETP-518 selectivo frente a HASPIN y los inhibidores de referencia, Senexina B y CCT251545, no indujeron apoptosis a las mismas dosis. Este dato corroboró la diferente actividad antiproliferativa observada entre inhibidores duales CDK8 / HASPIN e inhibidores selectivos para CDK8.

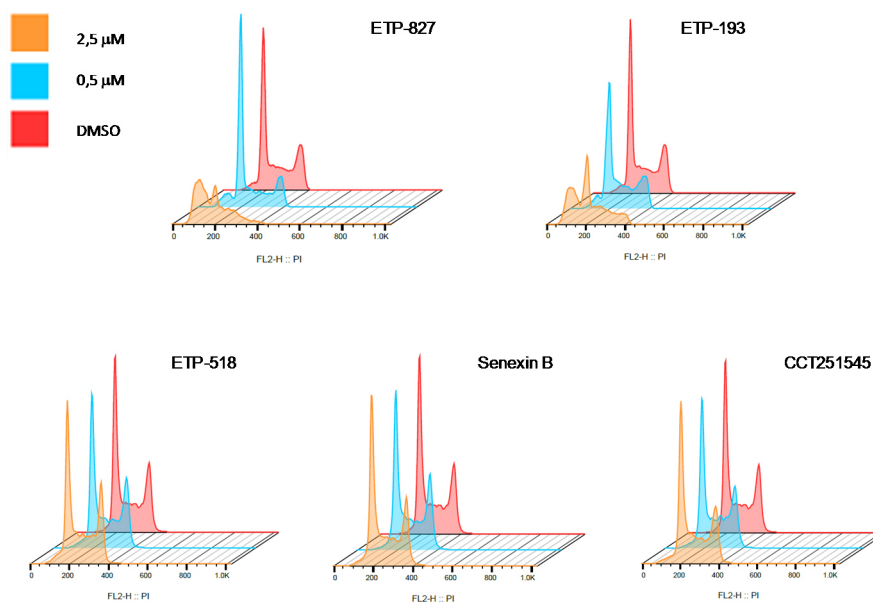


Figura 73. Perfil de ciclo celular después del tratamiento de 24 horas en la línea MOLM13 con los inhibidores ETP-827, ETP-193, ETP-518 y los inhibidores de referencia CCT251545 y Senexina B.

5. Discusión.

Las evidencias del papel oncogénico de CDK8 en varios tipos de cáncer ha estimulado el interés por el desarrollo de inhibidores frente a esta oncoproteína. Hasta la fecha se han desarrollado diferentes inhibidores de CDK8 duales CDK8 / CDK19, pero sólo el inhibidor BCD-115 (del cual no se ha hecho pública su estructura) se encuentra en ensayos clínicos en fase I para el tratamiento de pacientes de cáncer de mama avanzado metastásico (ER(+) y HER2 negativo)[26][124].

Los inhibidores de CDK8 / CDK19 publicados hasta la fecha se caracterizaron, en general, por su potencia bioquímica (nM y subnM), selectividad frente a las diferentes CDKs y frente a amplios paneles de quinasas. La mayoría de estos inhibidores actuaron regulando la vía de señalización WNT/ β -CATENINA implicada en CCR, aunque para algunos inhibidores se ha demostrado su implicación en otras vías de señalización. Por ejemplo, Senexina A inhibió la transcripción de p21, inducida por daño tisular en el entorno tumoral como consecuencia de los efectos secundarios de la quimioterapia. Cortistatina A aumentó la expresión de “superenhancer”s asociados con genes supresores de tumores y controladores de linaje celular [277]. Los inhibidores derivados de CCT251545, el CCT251921 y el MSC2530818, también regularon la expresión de genes implicados en el desarrollo óseo, sistema inmunológico y procesos inflamatorios. [102][132]

Mediante estudios cristalográficos estos inhibidores han sido identificados como inhibidores competitivos de ATP tipo I. No obstante algunos otros inhibidores han sido descritos como inhibidores tipo II: Sorafenib [115][142], ponatinib,[143] y linifanib [144][145]. Sin embargo a diferencia de los inhibidores tipo I, la potencia bioquímica de estos inhibidores no ha mostrado correlación con la inhibición de la vía WNT/ β -CATENINA ni con la modulación de la fosforilación del biomarcador STAT1-Ser727 en ensayos celulares.

Por otra parte, recientemente está en discusión la posible toxicidad de CDK8 como diana terapéutica. Concretamente, Clarke y colaboradores, trabajando con dos series químicas diferentes de inhibidores de CDK8, han mostrado signos de toxicidad con una pérdida de peso corporal en ratones y perfiles toxicológicos en ratas y perros. Estos experimentos revelaron efectos secundarios en órganos claves como médula ósea, corazón, hígado y pulmones [132]

Para el resto de inhibidores no constan estudios toxicológicos tan detallados y no se ha detectado efectos de toxicidad en ratón.

Por lo tanto, es evidente que existe la necesidad de identificar nuevos agentes terapéuticos dirigidos molecularmente contra CDK8 que muestren mejor índice terapéutico y de seguridad biológica. Nuestro objetivo fue desarrollar inhibidores de CDK8 / CDK19 que pudieran ser una alternativa farmacológica frente a los existentes, con un mejor índice terapéutico y sin efectos de toxicidad.

Así, se inició un proceso de identificación y optimización de inhibidores con propiedades pre-fármaco que diera lugar al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos dirigidos contra CDK8 con mejores propiedades que los inhibidores existentes.

Como punto de partida para la identificación de inhibidores de CDK8 / CDK19 se llevó a cabo una campaña de cribado aplicando la metodología de *HTS*. Se seleccionó un ensayo de unión basado en la tecnología Lanthascreen, ya que en el momento de iniciar esta tesis no estaba claramente identificado un sustrato específico de CDK8 disponible, para diseñar un ensayo bioquímico de actividad quinasa que cumpliera los criterios de calidad necesarios para abordar con suficiente sensibilidad, fiabilidad (ventana del ensayo) y robustez (reproducibilidad) las diferentes etapas del proceso. Si bien es cierto que se intentó diseñar un ensayo de actividad con el péptido derivado de E2F1, como sustrato referenciado de CDK8 [96][86], sin éxito alguno por no ajustarse a los criterios de calidad exigibles a las necesidades de *HTS*.

No obstante, la tecnología seleccionada, robusta y técnicamente sencilla, permitió en primer lugar agilizar el seguimiento de la actividad de los compuestos sintetizados durante las diferentes etapas del proceso de optimización de propiedades farmacológicas. Y en segundo lugar, dispusimos de una herramienta para realizar estudios de cinética de unión de los compuestos priorizados.

El ensayo de CDK8 se realizó sin pre-incubación y con lectura a tiempo final, tanto para el procedimiento de identificación de moléculas activas como para el seguimiento y detección de la actividad en las fases de HtL y LO, no se consideró pertinente dar ventaja competitiva de unión al inhibidor frente al trazador, como hubiera resultado si el ensayo se hubiera realizado con pre-incubación del complejo [EI]. Es posible que con este protocolo se hayan perdido moléculas con una cinética de unión más lenta.

Sin embargo, el ensayo para la determinación de las constantes cinéticas de unión del complejo binario inhibidor-enzima se realizó pre-incubando [EI] durante 1 hora. Así, empleando el método de dilución rápida [273] basado en un ensayo de competencia [278] [266] nos permitió estudiar el desplazamiento y disociación cinética del inhibidor del complejo [EI].

Gracias a este ensayo de lectura continua, a tiempos muy prolongados (300 minutos) pudimos detectar la fotosensibilidad de algunos de los compuestos, cuya posición 6 no se encontraba sustituida con un grupo diferente a hidrógeno, sustitución que demostró conferir estabilidad frente a la luz. Este fue el caso del ETP-289. El conocimiento de la fotosensibilidad de los compuestos fue de gran relevancia a la hora de trabajar con ellos.

Como se ha descrito en los apartados 4.2 de resultados, tras dos campañas de cribado y una fase de generación de moléculas activas o “hits” se seleccionó el ETP-749 como molécula de partida o cabeza de serie para iniciar una fase de HtL y LO. El ETP-749 perteneciente a la serie 5, fue priorizado por: i) su potencia en CDK8 (IC_{50} 3nM), ii) su alta selectividad en un

panel de más de 450 quinasas (Fig 56), la única quinasas identificada fue HASPIN, iii) su buena permeabilidad, solubilidad y estabilidad microsomal en humanos y rata aunque por optimizar en ratón (Fig 58), iv) por no presentar alerta de cardiotoxicidad y v), ser patentable en caso de conseguir una molécula optimizada con propiedades farmacológicas.

A su vez, en estudios de selectividad frente a las diferentes CDKs, tanto de las CDKs conocidas como de ciclo (CDKs 1, 2, 4, 5, 6) como las CDKs transcripcionales (CDKs 7 y 9) [279] y CDK19, el parálogo de CDK8, en conjunto el ETP-749 mostró una selectividad elevada, entre 4 y 2 ordenes de magnitud respecto la actividad de CDK8, excepto para CDK9 y CDK19.

La selectividad frente a las otras CDKs se podría explicar por las particularidades que presenta la estructura de CDK8, considerada una CDK atípica. El estudio de su estructura ha destacado aspectos diferenciados respecto a las otras CDKs que podrían influir en la selectividad de los compuestos: el motivo DFG en CDK8 es DMG (cambia la fenilalanina por una metionina). La hélice N-terminal (aB), ausente en otras CDKs y un aspecto importante, la ausencia de fosforilación en el T-loop para su activación (Fig. 74A) [110].

Por otra parte CDK19, parálogo de CDK8 presenta alta similitud estructural con CDK8[54]. Tal como se observa en la figura del alineamiento de las secuencias (Fig. 74B), tanto las regiones implicadas en la unión a ATP (“*hinge*”; dominio de unión a adenina), como el dominio de unión a los inhibidores tipo I (DMG), el dominio de unión a CICLINA C y el dominio del bucle de activación o T-loop (dominio de unión a fosfato) son regiones altamente conservadas en estas dos quinasas. Por lo tanto, no es de extrañar que los inhibidores de CDK8 también lo sean de CDK19. De hecho todos los inhibidores reportados son duales CDK8 / CDK19.

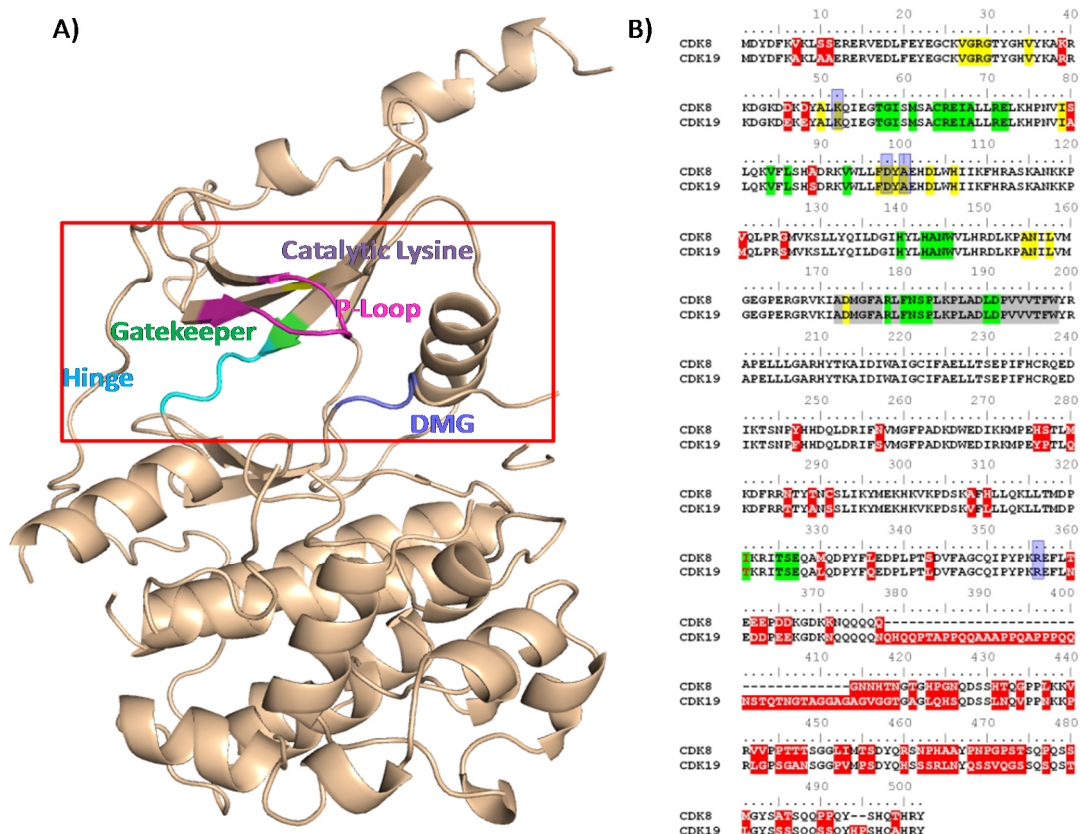


Figura 74. Similitudes entre CDK8 y CDK19.

A) Estructura de CDK8, dominios de unión a ATP (Hinge, lisina catalítica, bucle de activación o T-loop, gatekeeper, DMG). B) Alineamiento de secuencias de aminoácidos de CDK8 y CDK19 humanas. En color rojo se representan secuencias diferentes, en amarillo la región del dominio de unión ATP, en verde el dominio de unión a CICLINA C, en gris región el T-loop, y en azul la región de unión a inhibidores. A) The PyMOL Molecular Graphics System (2002) on World Wide Web <http://www.pymol.org>. B) Clarke y col .2016 [280].

Una vez identificado el ETP-749 como molécula de partida, en las fases de HtL y LO se siguió el flujo de trabajo descrito en la figura 75. La fase de HtL implicó la exploración químico-médica del ETP-749 y la caracterización y perfilado extensivo de los análogos preparados incluyendo ensayos *in vitro* de CDK8, HASPIN, selectividad frente a un panel de CDKs y el perfilado ADME-T y ensayos farmacocinéticos *in vivo*.

Todos estos estudios proporcionaron información esencial para la optimización multifactorial del ETP-749 y obtener moléculas más avanzadas con perfil farmacológico del compuesto, definido en términos de propiedades químicas, biológicas y farmacológicas, es

decir potencia, selectividad y características ADME-T in vitro e in vivo como son el aclaramiento y la permeabilidad.

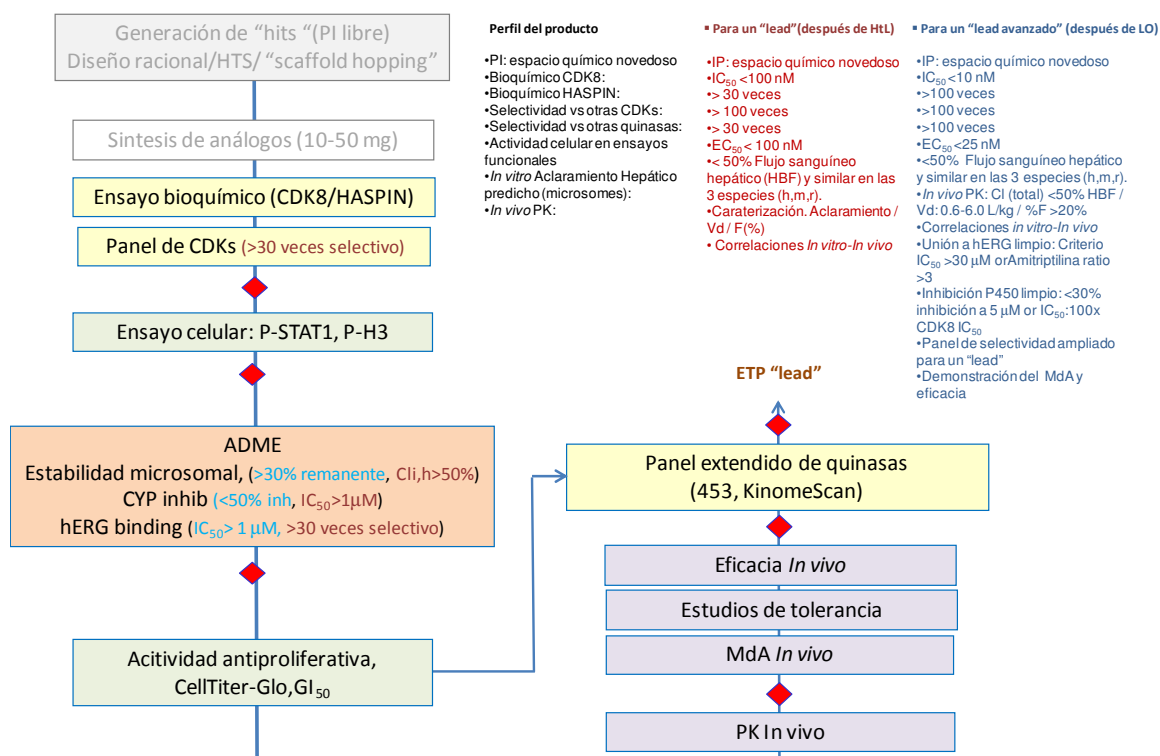


Figura 75. Flujo de trabajo en las fases de HtL y LO para el desarrollo de inhibidores de CDK8.

Se indica el perfil requerido para seleccionar una molécula como "lead" o candidato en la fase de HtL o como "lead" o candidato avanzado en la fase de LO.

Siguiendo el flujo de trabajo anteriormente descrito, en la fase de HtL se establecieron relaciones estructura actividad (SAR) y propiedades (SPR) tras explorar las 7 posiciones de la estructura del ETP-749 (Fig. 55A). Se introdujeron modificaciones de forma individual o en combinación, como podían ser grupos alquilos, metilos, aminas, aromáticos, etc (por parte de la sección de QM) y se caracterizaron a nivel bioquímico, celular y de ADME-T.

Dado que el ETP-749 era un inhibidor de CDK8 pero con efecto inhibitorio potente también en HASPIN (del orden nanomolar) a la hora de caracterizar los nuevos análogos se estudió en paralelo en todo el proceso la inhibición de ambas proteínas.

Con el fin de identificar las posiciones que contribuyeran a obtener inhibidores selectivos de CDK8, fueron exploradas las diferentes posiciones de la estructura del

farmacóforo, obteniendo información sobre que posiciones y tipo de grupos funcionales contribuían a una mejora de la actividad y/o de las propiedades de la molécula y cuales suponían detrimento de la actividad y propiedades.

En total se caracterizaron 97 compuestos y mediante los estudios de SAR se observó que las modificaciones simultáneas en las posiciones R4 y R5 fueron las que derivaron en el mantenimiento o mejora de la inhibición de CDK8 respecto al ETP-749. El 100% de los compuestos con este patrón de sustitución presentaron una IC_{50} para CDK8 inferior a 10nM (Fig 59). Del mismo modo, la mayor actividad de los análogos frente a HASPIN, respondió al mismo patrón de posiciones R4 y R5, mientras que las sustituciones en R5 o R5 y R6, fueron las que confirieron menor actividad en HASPIN y mayor selectividad frente a CDK8. De los resultados se desprendió que la mayoría de los análogos mostraron mayor actividad frente a CDK8 que frente a HASPIN (en un orden de magnitud).

Posteriormente se evaluó la correlación entre la inhibición bioquímica y la modulación de la diana a nivel celular. Para ello fueron seleccionados los compuestos de mayor potencia ($IC_{50} \leq 100nM$) y fueron estudiados en la línea celular SW620, que sobreexpresa CDK8, la modulación de la fosforilación de STAT1 en la Ser727 como sustrato de CDK8 y la modulación de la H3 en la Thr3 como sustrato de HASPIN. En general, los resultados indicaron una buena correlación entre la inhibición celular y bioquímica de CDK8 y HASPIN.

Para determinar cómo las diferentes sustituciones afectaban a la selectividad frente a otras CDKs se seleccionaron los compuesto con una $IC_{50} \leq 10nM$ (Fig. 60). Como era de esperar, todos los compuestos mostraron una potencia similar en la inhibición de CDK8 y CDK19. En general, la mayoría de compuestos fueron selectivos frente a las CDKs del ciclo y frente a CDK7, mientras que resultaron ser menos selectivos frente a CDK9, con un 33 % de los compuestos con potencia por debajo de 100nM, no obstante el dato bioquímico no se correlacionó con el dato en ensayo celular para esta CDK.

Posteriormente, para establecer las relaciones de SPR se estudió el perfil de propiedades ADME-T y propiedades fisicoquímicas de 19 compuestos con $IC_{50} \leq 10nM$, que cubrían sustituciones en las 7 posiciones de la molécula. La mayoría de los compuestos fueron estables en microsomas humanos, en microsomas de rata presentaron una estabilidad intermedia y en microsomas de ratón algo más de la mitad de los compuestos mostraron estabilidad aceptable para ser progresados en estudios farmacocinéticos. (Fig. 62A y tabla suplementaria 3).

La baja estabilidad en microsomas de ratón se podría explicar debido a que el metabolismo en ratones es mucho más rápido que en humanos y rata. No obstante, uno de los problemas asociados a los modelos predictivos de estabilidad microsomal *in vitro* es la correlación con los resultados *in vivo*. Por ello, es necesario en etapas más avanzadas llevar a cabo estudios farmacocinéticos *in vivo* para tener un datos más consistente de la estabilidad de los compuestos. De ahí, que no sólo se seleccionaron compuestos con una estabilidad microsomal superior al 70%, si no que por encima del 25% se consideró interesante para su progresión en el estudio.

Tras todo el perfilado se seleccionaron los compuestos ETP-827, ETP-846 y ETP-193 por ajustarse al perfil de producto según los criterios establecidos para la fase de HtL (Fig. 75) para estudiar su farmacocinética. Los tres compuestos presentaron potencia nanomolar baja en CDK8, un factor de selectividad frente a CDKs superior a 30, buen perfilado ADME-T, y la selectividad frente a HASPIN no fue superior a 30 veces, pero como se ha indicado fue un factor a tener en cuenta para optimizar en la fase de LO. El mejor perfil farmacocinético, lo mostró el compuesto ETP-193, con una $T_{1/2}$ de 0.9h, que fue seleccionado como compuesto líder de la fase de LO.

Complementariamente, mediante técnicas cristalográficas fue identificado el modo de unión de una de las moléculas avanzadas el ETP-827. Se obtuvo el co-cristal de CDK8 con este inhibidor, lo cual confirmó que el ETP-827 era un inhibidor competitivo de ATP tipo I, que se

unía a la conformación activa DMG “in” de CDK8. Las interacciones más destacadas del compuesto con los residuos de los diferentes regiones del dominio catalítico y bolsillo de ATP (“hinge”, lisina catalítica, bucle de activación, dominio DMG y “gatekeeper”) fueron preferentemente de tipo electrostático y de Van der Waals (Fig76).

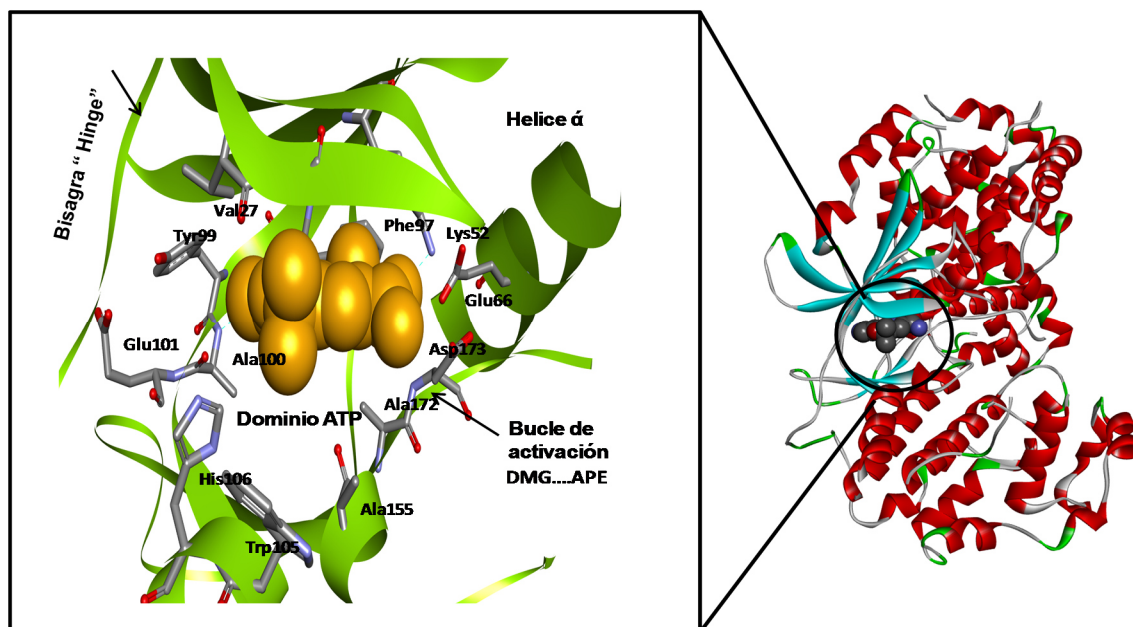


Figura 76. Estructura del co-cristal del ETP-827 con CDK8 / CycC.

Co-cristal generado por la Unidad de ingeniería de proteínas y cristalografía del CNIO: En la imagen ampliada CDK8 / CycC, se muestra en verde y el compuesto en naranja. Imagen obtenida con el programa: Discovery Studio 3.5

En la fase de LO se prestó especial énfasis en optimizar la selectividad frente a HASPIN de los compuestos líderes, además de mejorar el perfil de estabilidad microsomal en rata y ratón, en la medida de lo posible, con el objetivo de obtener un número mayor de compuestos con potencial para derivarlos a estudios farmacocinético y progresarlos a estudios de PK/PD y eficacia para poder realizar la prueba de concepto in vivo.

Como se puede observar en la Fig 81 durante la fase de LO se siguió el mismo flujo de trabajo que en la fase de HtL, pero las características del perfil del producto para esta fase fueron más exigentes. En esta fase se diseñaron 46 nuevos compuestos introduciendo nuevas sustituciones en las posiciones preferentes identificadas en la fase de HtL. El 80% de los nuevos

análogos presentaron una IC_{50} frente a CDK8 inferior a 100nM y el 40% de los compuestos activos presentó una ratio de selectividad frente a HASPIN respecto a CDK8 superior a 50, teniendo en cuenta todas las posiciones estudiadas.

Los estudios de SAR de los análogos más selectivos frente a HASPIN indicaron el mismo patrón de sustitución preferido, R4 y R5. Los compuestos que respondieron a este patrón presentaron mayor selectividad frente a HASPIN respecto a CDK8, con ratios de selectividad superiores a 100 veces. Tras el perfilado de propiedades fisicoquímicas y ADME-T, se seleccionados 3 compuestos: ETP-518, ETP-324 y ETP-358 con diferentes grados de selectividad frente a HASPIN, más de 100 veces, más de 2000 veces y menos de 100 veces respectivamente. De los estudios farmacocinéticos realizados con estos compuestos se desprendió que el ETP-358 no mejoró los niveles del ETP-193 tras la administración oral, por lo que no se progresó para estudios de PK/PD al tratarse de un inhibidor con un perfil más dual CDK8 / HASPIN (Fig. 65).

De los compuestos CDK8 selectivos se priorizaron tanto el ETP-518 como el ETP 324 para estudios de PK/PD y eficacia, para poder evaluar si los niveles alcanzados eran suficientes para modular la actividad de CDK8 en un modelo tumoral en ratón y comparar la eficacia entre inhibidores con perfiles de inhibición más o menos selectivos frente a CDK8. Además disponer de inhibidores selectivos CDK8 y duales CDK8 / HASPIN puede ser de gran utilidad para estudiar la posible toxicidad de la inhibición de CDK8 descrita por Clarke y colaboradores [132].

Ante la posibilidad de que los inhibidores de CDK8 se puedan administran en combinación se prestó especial atención a los estudios de posibles interacciones entre fármacos DDI, “Drug-Drug interaction”. La modulación de las enzimas, CYPs, que intervienen en la biotransformación mediada por el metabolismo hepático son considerados factores de riesgos

por la susceptibilidad que presentan a ser modulados por los fármacos mediante su inducción o su inhibición [219][226].

Por ello, se estudiaron los CYPs más importantes que participan en el metabolismo de biotransformación de fármacos en hígado (CYPs: 3A4, 2C9, 2C19, 2D6, 1A2). En la fase de HtL solamente el 5% de los compuestos mostraron inhibición superior al 70% de las isoformas CYP1A2, CYP2C9 y el CYP3A4 (Fig. 68). En la fase de LO solo algunos de los compuestos presentaron inhibición en el rango micromolar alto de la isoforma CYP3A4, en general 1000 veces superior a la inhibición bioquímica de CDK8. De todos los modos, los compuestos seleccionados como moléculas avanzadas en esta fase mostraron un perfil sin interacciones en las cinco isoformas y sólo el ETP-518 presentó una inhibición micromolar de la isoforma CYP1A2 (Tabla 22). No obstante, esta inhibición no parecería relevante, pues la participación de esta isoforma en los procesos de biotransformación en hígado representa entorno al 3% del total de fármacos y xenobióticos.

Como resultado global de las diferentes etapas de exploración, generación y optimización se identificaron 6 inhibidores con perfil de fármaco, tres de ellos se encuentran actualmente en fase de estudio de PK/PD en ratón y estudios de tolerancia y eficacia en ratón y rata para poder evaluar y comparar su posible toxicidad con los inhibidores descritos por Clarke.

Se ha demostrado que la combinación de técnicas de SAR con SKR en la optimización de fármacos tiene un valor añadido y ofrece varias ventajas sobre el paradigma SAR tradicional [246]. Un ejemplo fue la optimización de ligandos del receptor CCR2 de quimioquinas basada en la combinación de SAR y SKR. Inicialmente la molécula fue optimizada basándose sólo en la afinidad, obteniendo moléculas con elevada afinidad, pero con tiempo de residencia cortos. Sin embargo cuando la optimización se focalizó también en la cinética de unión, se obtuvieron ligandos de alta afinidad y tiempos de residencia más prolongados [281].

Por otro lado, dependiendo de la diana y su mecanismo molecular puede interesar tener tiempos de residencia largos o no. Por ello, para ayudar a la selección final de moléculas a progresar a los estudios de prueba de concepto *in vivo* algunos de los inhibidores se caracterizaron a nivel de su cinética de unión. Se seleccionaron 6 compuestos tras las fases de HtL y LO para evaluar la contribución de las sustituciones introducidas en el cabeza de serie ETP-749 a la optimización del tiempo de residencia de la unión [EI] y a su vez fueron comparados con inhibidores de CDK8 descritos previamente como el CCT251545 y la Senexina B.

En primer lugar, se estudió si el modo de asociación o disociación de los inhibidores con su diana [EI] se producía lentamente o de forma “rápida” [282]. Este tipo de estudios nos informaron de cómo, en términos cinéticos, se producía el equilibrio entre las formas libres de los ligandos [E] e [I] y la forma asociada [EI]. Además, este tipo de experimento nos dio una idea preliminar de si los inhibidores presentaban un tipo de inhibición tiempo dependiente.

Del análisis de las curvas de inhibición y de los valores observados de IC_{50} en los dos intervalos de tiempo estudiados se desprendió que el conjunto de los análogos mostró una asociación rápida en la interacción inhibidor-enzima (Fig. 66). En general, no se observaron diferencias significativas de potencia (IC_{50}) en los dos intervalos de tiempo estudiados (Fig 66A).

En términos generales, los análogos no parecían responder a un mecanismo de inhibición tiempo dependientes mostrando una asociación rápida con CDK8, alcanzando la saturación del complejo [EI] (entorno al 90%) a los 20 minutos de iniciar la cinética. Sólo el inhibidor ETP-289 refirió un comportamiento sutilmente diferenciado respecto al conjunto de análogos.

El inicio de la inhibición de este compuesto se produjo de forma más lenta con un ligero incremento de potencia a los 60 minutos (2,5 veces respecto a los 20min.). El compuesto de referencia CCT152545, exhibió un comportamiento similar al ETP-289 y la Senexina B mostró un comportamiento similar al resto de los análogos de ETP. Quizás estas pequeñas diferencias en el modo de unión de nuestros análogos respecto al CCT152545 podrían contribuir a reducir el perfil de toxicidad observado para este último, pues la durabilidad de los efectos farmacológicos, más cortos podría favorecer la reducción de efectos citotóxicos “*off target*”.

En cuanto a la determinación de los parámetros cinéticos $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ y tiempo de residencia, los resultados indicaron que el ETP-193 mostró un tiempo de residencia optimizado, entorno a 3 veces superior respecto al cabeza de serie y respondió a una cinética de disociación (k_{off}) del complejo [EI] más “lenta” respecto al compuesto cabeza de serie ETP-749.

No obstante, los inhibidores exhibieron tiempos de residencia inferiores a 1 hora y por lo tanto respondieron a una cinética de disociaciónn relativamente “rápida” y tiempos de residencia relativamente cortos comparados con los inhibidores que exhiben mecanismo de inhibición tipo II, asociados con tiempos de residencia prolongados para algunos tipos de inhibidores (Sorafenib)[112]

El ETP-289 fue el análogo que mostró el tiempo de residencia más bajo del conjunto (7 minutos), mostrando una cinética de disociación del complejo [EI] rápida y la k_{off} más alta respecto al conjunto de análogos. Este compuesto singular dentro del grupo presentó una sustitución en la posición R6 diferente respecto al resto de los análogos estudiados que podría contribuir al perfil diferenciado respecto al conjunto de análogos. La generación del co-cristal de este inhibidor con CDK8 sería de gran interés para observar las diferencias en las interacciones con CDK8, respecto al resto de los análogos

Por otra parte, el inhibidor de referencia CCT251545 presentó un tiempo de residencia de 54 minutos, mostrando la k_{off} más baja del grupo (Tabla 25) y una cinética de disociación del complejo [EI] más lenta respecto al conjunto de los análogos. Este dato correlacionó con los reportados en la literatura [95]. En relación a Senexina B, mostró un tiempo de residencia y una k_{off} similar a los inhibidores análogos.

Dado que el CCT251545 ha sido uno de los compuestos para los que se ha reportado datos de toxicidad en ratas y perros [134], la comparativa con nuestros inhibidores en ensayos de tolerancia en ratas podría ayudar a concluir si realmente en el caso de CDK8 interesa un perfil de inhibidores con tiempos de residencia cortos, es decir, un mecanismo de disociación “rápida” con efectos potencialmente menos duraderos, pero en equilibrio con un buen comportamiento farmacocinético, respecto a los niveles en sangre, buen índice de eficacia farmacológica y bajos o nulos efectos de toxicidad off target.

En la literatura se ha puesto de manifiesto cierta controversia acerca de la relación directa entre la afinidad y el tiempo de residencia de los inhibidores. Por un lado, hay autores que correlacionan directamente una alta afinidad de una droga por su diana con tiempos de residencia prolongados en la unión del complejo [EI] y con ello una mayor eficacia farmacológica [233] [240][244]. Sin embargo, otros autores sostienen que esta relación no es enteramente válida [281].

Como se ha descrito en la introducción, estudios de relación estructura cinética con inhibidores pertenecientes a la misma serie química, exhibiendo alta afinidad (K_d) y compartiendo farmacóforo e interaccionando con la misma diana pueden presentar perfiles de cinética de unión muy diferentes [243] [246]. Por ejemplo, los inhibidores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), lapatinib y gefitinib, son compuestos derivados diseñados a partir del mismo farmacóforo, muestran una K_d en rangos similares y sin embargo presentan tiempos de residencia muy diferentes (Fig. 34)[246] [243]. De la misma manera, hay autores

que indican que no solo la afinidad determina el comportamiento cinético de unión entre ligando y receptor. El entorno químico y otros descriptores moleculares, como pueden ser el tipo de interacciones, hidrofobicidad, puentes de hidrógeno o los cambios conformacionales de la proteína, pueden condicionar y determinar la cinética de unión [283] [243][284].

Como se puede observar en la figura 66 y en la tabla 25 todos los inhibidores presentaron alta afinidad por CDK8 ($\leq 30\text{nM}$ salvo Senexina B $\geq 30\text{nM}$) y tiempos de residencia “cortos” (≤ 17 minutos) a diferencia del ETP-193 y el compuesto de referencia CCT251545 con tiempos de residencia más largos de 36 y 54 minutos respectivamente. Estos resultados indicaron que no todos los análogos estudiados presentaban una correlación entre la afinidad y el tiempo de residencia a pesar de ser compuestos con una alta analogía estructural y compartir farmacóforo. Lo cual podría estar indicando que las diferentes sustituciones introducidas han dado lugar a la optimización de inhibidores con alta afinidad (K_d). Sin embargo, los análogos estudiados presentaron un comportamiento homogéneo respecto al perfil de su cinética de unión. Es obvio, que este comportamiento responde a la analogía estructural que presentan, donde los diferentes patrones de modificaciones química introducidos probablemente no hayan sido relevantes en cuanto a la contribución a cambios topológicos, ni de acomodamiento que pudieran dar lugar a diferentes tipos de interacciones en regiones claves para modificar el tiempo de residencia, a excepción del ETP-193.

Así, los resultados obtenidos de tiempos de residencia, cortos, en términos cuantitativos, estarían en concordancia con un modelo de inhibidores competitivos de ATP tipo I. Estos inhibidores se unirían a la conformación activa DFG “in” y no inducirían cambios conformacionales de la quinasa. Así, se caracterizarían por una cinética de disociación (k_{off}) más rápida y un tiempo de residencia corto [242] [285]. Mientras que los inhibidores competitivos de ATP Tipo II se unirían a la conformación no activa DFG “out” de las quinasas

y se caracterizarían por una cinética de disociación (k_{off}) más lenta y tiempos de residencia más largos.

No obstante, estudios realizados de SKR con inhibidores de CDK8 han revelado que no sólo la conformación DMG “out” es determinante para obtener tiempos de residencia más largos, las interacciones de puente de hidrógeno con la región bisagra, o las interacciones hidrofóbicas dentro del bolsillo frontal de la región de ATP, contribuirían al diseño de compuestos con una disociación más lenta e incrementar el tiempo de residencia de estos inhibidores [243].

Por otro lado, sería interesante relacionar los mecanismos de dinámica molecular con la respuesta terapéutica de un fármaco y diseñar agentes que se ajustaran a los tiempos de residencia cortos o largos para obtener la respuesta terapéutica deseada con bajos efectos secundarios. Hay fármacos que tienen una respuesta terapéutica asociada a tiempos de residencia largos y pueden producir efectos beneficiosos duraderos y baja toxicidad. Del mismo modo, algunas drogas como por ejemplo ligandos de receptores acoplados a proteínas G con tiempo de residencia corto, pero beneficiosos para reducir potenciales efectos secundarios.

Las simulaciones de dinámica molecular y la cinética de unión, podrían contribuir al diseño de este modelo de fármaco y por lo tanto, podría ser interesante la información que aportarían estos parámetros de forma complementaria en el proceso de selección y optimización de compuestos líderes [246]. Además, en el caso concreto de CDK8 esto podría ser un factor importante para comparar inhibidores para los que se han descrito efectos tóxicos con nuevos inhibidores y poder seleccionar aquellos con un perfil de toxicidad potencial diferente.

Al final de la fase de LO se compararon los perfiles bioquímico y celulares de las moléculas avanzadas ETP-827, ETP-193 y ETP-518 con los compuestos de referencia

CCT251545 y Senexina B, estudiando su comportamiento en ensayos de proliferación y ciclo celular.

Los inhibidores ETP-827 y ETP-193 mostraron una actividad importante frente a HASPIN, correlacionando los datos bioquímicos con los resultados de modulación del biomarcador H3-Thr3. Por su parte, el análogo ETP-518 presentó menor actividad frente a HASPIN (en torno a dos órdenes de magnitud, en el ensayo bioquímico y tres órdenes de magnitud en la modulación del biomarcador). Mientras que los compuestos de referencia CCT251545 y Senexina B fueron altamente selectivos frente a HASPIN (Tabla 17). Para ver el efecto de los diferentes perfiles en la proliferación celular se trataron 4 líneas celulares, dos líneas de leucemia mieloide aguda (MV4-11 y MOLM13), una línea de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231) y una línea de cáncer de colon (SW620). Las líneas de LMA y CCR se seleccionaron, ya que otros inhibidores de CDK8 habían mostrado actividad en dichas líneas y en el caso de MDAMB231 había sido identificada como sensible tras obtener su perfil de actividad en un panel de 40 líneas celulares el ETP-827 (datos no reportados). Los resultados indicaron que los inhibidores duales mostraron mayor potencia antiproliferativa en las 4 líneas celulares estudiadas. Mientras que los inhibidores más selectivos para CDK8, como el ETP-518 y los inhibidores de referencia, se observó que solo en el caso de las líneas de leucemia la GI_{50} estaba por debajo de $10\mu M$, y la respuesta observada para la línea de cáncer de mama y de colon fue en la mayoría de los casos superior a $50\mu M$.

Los datos publicados del compuesto CCT251545 indicaron que inhibía a nivel nanomolar la vía de señalización WNT/ β -CATENINA y la fosforilación de STAT1-Ser727. En ensayos de proliferación en “soft agar”, es decir, crecimiento independiente de anclaje y tras tratamientos de 14 días la GI_{50} fue micromolar bajo [95], mientras que en ensayos de proliferación similares a los nuestros tras 4 días de tratamiento no se observó ningún efecto[132], correlacionando bien con nuestros datos. Respecto a Senexina B, en combinación

con fulvestrant inhibió la proliferación de líneas de cáncer de mama receptor de estrógeno positivas. En nuestro caso en la línea de TNBC no se observó ningún efecto así como en la línea de cáncer de colon [98]. Respecto a las líneas de LMA, se ha reportado el efecto antiproliferativo para diferentes inhibidores de CDK8 como la Cortistatina [277], Senexina B y SEL120-34 [40] en la línea MV4:11. El ETP-518 más selectivo para HASPIN presentó una actividad antiproliferativa más parecida a Senexina B y CCT251545, confirmando la diferente actividad antiproliferativa según el perfil dual o no de los inhibidores.

En ensayos de ciclo celular los inhibidores duales ETP-827 y ETP-193 indujeron muerte celular de manera dosis dependiente en la línea MOLM13 lo que correlacionó con la mayor sensibilidad antiproliferativa observada para esta línea. Por otra parte, el ETP-518 y los inhibidores de referencia, no indujeron apoptosis, en esta misma línea celular a la máxima concentración ensayada. Estos resultados preliminares nos indicarían que la característica dual CDK8 y HASPIN, podría suponer una ventaja respecto a los inhibidores de CDK8 identificados hasta la fecha, pues dosis más bajas de los inhibidores podrían tener un mayor potencial terapéutico y así a su vez aumentar la ventana terapéutica y quizás evitar la toxicidad descrita para otros inhibidores de CDK8 [134].

La inhibición dual de CDK8 y HASPIN observada para algunos de los compuestos desarrollados a lo largo de las fases de HtL y LO y en concreto el ETP-827 y el ETP-193 como moléculas más avanzadas con este perfil, en general, ha supuesto una mayor afinidad en CDK8 que en HASPIN con un orden de magnitud de diferencia tanto a nivel bioquímico como a nivel celular. Con el fin de entender esta diferencia de afinidad entre las dos quinass en la Figura 77A y B se describen las diferentes regiones estructurales del dominio quinasa de CDK8 y HASPIN respectivamente. Son regiones altamente conservadas en la mayoría de las quinass: i) el Hinge o Bisagra, donde interactúa la adenina del ATP mediante puentes de hidrogeno, ii) el P-loop donde se une a los fosfatos que no son transferidos al sustrato y iii) el Gatekeeper junto a la

lisina catalítica que separa el bolsillo frontal y posterior del ATP. Como ya se ha comentado, la región altamente conservada DFG situada al inicio del bucle de activación, permite el acoplamiento del ATP. En CDK8 esta triada es DMG, cambia la fenilalanina por metionina, y en el caso de HASPIN es el motivo DYT que estructuralmente presenta mayor similitud al DFG. En las Fig 83C y D se representan los 20 residuos del dominio quinasa que interaccionan con el el inhibidor ETP-827. Las interacciones son preferentemente de tipo Van der Waals y electrostáticas.

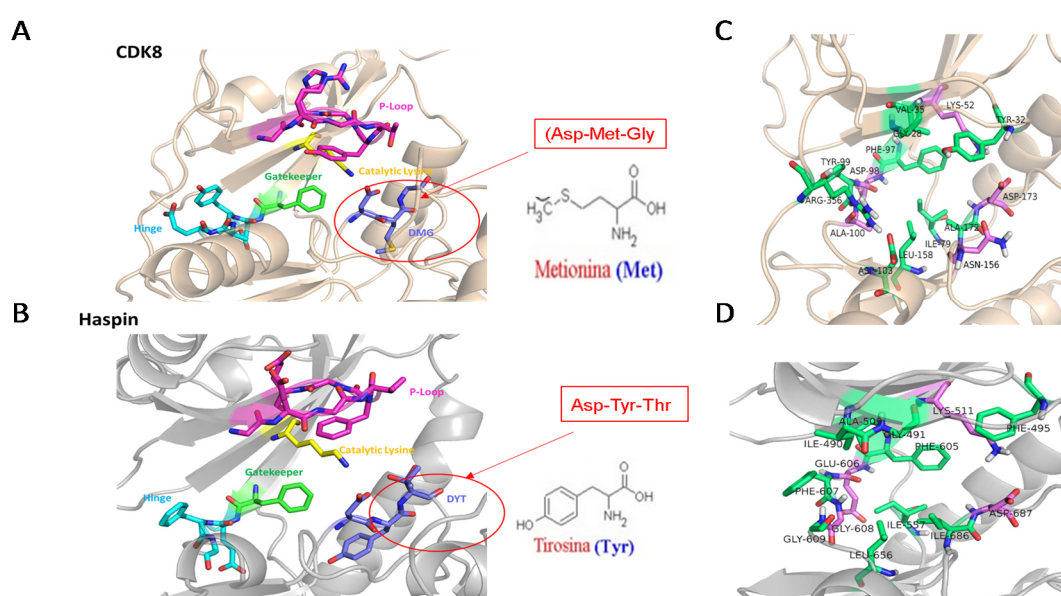


Figura 77. Dominio quinasa de CDK8 y HASPIN residuos más relevantes.

A y B) Descripción de los motivos del dominio quinasa en CDK8 y HASPIN. C y D) Residuos más importantes que interaccionan con el ETP-827 en CDK8 y HASPIN respectivamente. Imágenes obtenidas con DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System (2002) on World Wide Web <http://www.pymol.org>.

La inhibición dual de CDK8 y HASPIN observada para algunos de los compuestos desarrollados a lo largo de las fases de HtL y LO, ETP-827 y el ETP-193 como moléculas más avanzadas con este perfil, en general ha supuesto una mayor afinidad en CDK8 que en HASPIN con un orden de magnitud de diferencia tanto a nivel bioquímico como a nivel celular. Los estudios de alineamiento en 1D + 3D de las secuencias del dominio quinasa de CDK8 y HASPIN indicaron una identidad global de 18% y de un 48% respecto al número total de

residuos (21 posiciones) que interaccionan con el compuesto ETP-827 en las dos quinasas (Fig. 78).

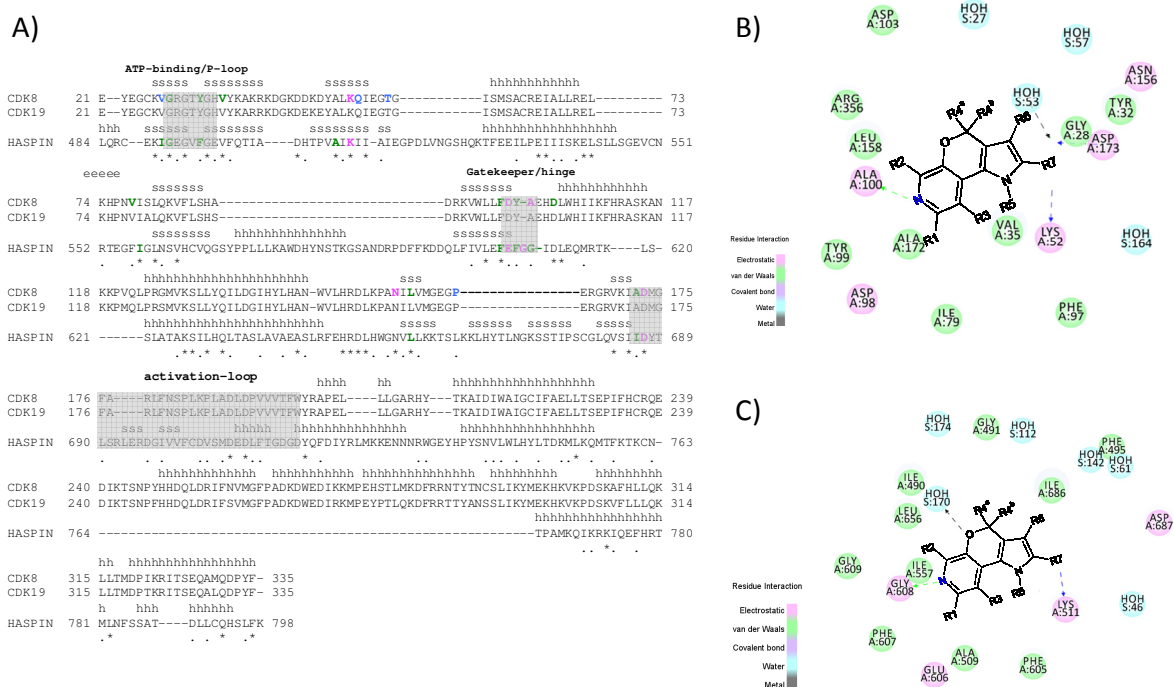


Figura 78. Interacción del ETP-827 con CDK8 y HASPIN obtenida mediante cristalografía.

A) Alineamiento de las secuencias del dominio catalítico de CDK8, CDK19 y HASPIN. * los residuos idénticos, marcados con asterisco y residuos similares (en tipo de interacción hidrofóbicos, polares) marcados con punto. B) y C) Mapa de interacciones con CDK8 y HASPIN respectivamente. Imágenes obtenidas mediante <https://www.uniprot.org>. <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo> <http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm>

En general, como ya se ha indicado anteriormente el segmento de activación del dominio quinasa es un elemento regulador formado por 35 residuos, localizado entre dos motivos de secuencia conservados Asp-Phe-Gly (DFG) y Ala-Pro-Glu (APE). El segmento de activación de HASPIN cambia el motivo DFG por Asp-Tyr-Thr (DYT) y el bucle de activación es más corto [286]. En CDK8 el motivo DFG, cambia por Asp-Met-Gly (DMG). La metionina es un residuo menos voluminoso que los residuos aromáticos de tirosina y fenilalanina en los motivos DYT y DFG, respectivamente. El motivo DMG es clave para la actividad de CDK8 [276]. Sin embargo, el residuo de tyrosina en el motivo DYT de HASPIN podría provocar un mayor impedimento estérico en la unión del compuesto, y por lo tanto mostrar una menor

afinidad respecto a CDK8. Para estudiar en detalles estos posibles efectos estéricos sería necesario utilizar métodos complementarios como las simulaciones de dinámica molecular.

En conclusión, en este trabajo se han desarrollado inhibidores de CDK8 con dos perfiles diferenciales, selectivos frente a HASPIN o duales. En ambos casos se han conseguido moléculas optimizadas que alcanzan niveles en sangre adecuados para poder evaluar el potencial de ambos tipos de inhibidores en modelos tumorales de ratón y a su vez estudiar su potencial toxicidad en ratas.

6. Conclusiones

1. El ensayo de *binding* de CDK8 ha sido valido para llevar a cabo dos campañas de cribado, la fase de generación de moléculas activas, la fase de HtL, LO y la caracterización cinética de las moléculas más avanzadas.
2. Tras dos campañas de cribado, con una librería enfocada y otra de la JHU, y la fase de generación de moléculas activas, el ETP-749 fue identificado como una buena molécula de partida con potencia bioquímica y celular, buenas propiedades ADME-T y propiedad intelectual.
3. La optimización multifactorial del ETP-749 en la fase de HtL permitió la identificación de compuestos duales CDK8 / HASPIN ETP-827 y ETP-193 como moléculas avanzadas para una optimización más fina en la fase de LO.
4. El ETP-827 y el ETP-193 mostraron actividad celular inhibiendo potentemente la fosforilación de STAT1-Ser727 y de H3-Thr3, en un rango subnanomolar y nanomolar correlacionando bien con los datos bioquímicos. Su selectividad frente a otras CDKs tanto a nivel bioquímico como celular fue de más de 100 veces. Los compuestos demostraron alta solubilidad y permeabilidad y estabilidad microsomal para obtener niveles en sangre tras administración oral suficientes para realizar estudios de PK/PD y eficacia. Los inhibidores no presentaron alerta de cardiotoxicidad.
5. El ETP-518 y el ETP-324 fueron identificados como inhibidores de CDK8 / CDK19 selectivos frente a HASPIN tras la optimización multifactorial de la fase de LO, con niveles en sangre para su progresión para estudios *in vivo*.
6. Los inhibidores duales CDK8 / HASPIN mostraron mayor potencia antiproliferativa en las 4 líneas celulares tumorales ensayadas que los inhibidores de CDK8 selectivos, con

valores de GI_{50} inferiores a $1\mu M$ en las líneas de LMA y inferiores a $10\mu M$ en las líneas de cáncer de mama y colon.

7. El ETP-518, inhibidor de CDK8 más selectivo, y los compuestos de referencia CCT251545 y Senexina B, selectivos frente a HASPIN, mostraron perfiles de antiproliferación parecidos, siendo las líneas de LMA las únicas sensibles, aunque con valores de GI_{50} superiores a las de los inhibidores duales.
8. El ETP-827 y el ETP-193 indujeron muerte celular de manera dosis dependiente en la línea celular MOML13 de LMA, mientras que este efecto de inducción de apoptosis no fue observado con los inhibidores de referencia o el ETP-518.
9. Los 6 compuestos estudiados con perfiles pre-fármacos mostraron alta afinidad por CDK8, con un perfil de disociación cinética rápida y un tiempo de residencia corto, en concordancia con el modo de unión que muestran los inhibidores competitivos de ATP tipo I.

Bibliografía

- [1] M. De Palma and D. Hanahan, "The biology of personalized cancer medicine: Facing individual complexities underlying hallmark capabilities," *Mol. Oncol.*, vol. 6, no. 2, pp. 111–127, 2012.
- [2] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The hallmarks of cancer," *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, 2000.
- [3] C. Sonnenschein and A. M. Soto, "The death of the cancer cell," *Cancer Res.*, p. canres-0639, 2011.
- [4] S. Maman and I. P. Witz, "A history of exploring cancer in context," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 18, no. 6, pp. 359–376, 2018.
- [5] R. A. Burrell, N. McGranahan, J. Bartek, and C. Swanton, "The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution," *Nature*, vol. 501, no. 7467, pp. 338–345, 2013.
- [6] M. Corbin and S. Morrison, "Tumor heterogeneity and cancer cell plasticity," *Nature*, vol. 501, no. 7467, pp. 328–337, 2013.
- [7] J. Ferlay *et al.*, "Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012," *Int. J. Cancer*, vol. 136, no. 5, pp. E359–E386, 2015.
- [8] M. H. Forouzanfar *et al.*, "Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015," *Lancet*, vol. 388, no. 10053, pp. 1659–1724, 2016.
- [9] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco," vol. 100, pp. 57–70, 2000.
- [10] B. A. Chabner and T. G. Roberts, "Timeline: Chemotherapy and the war on cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, no. 1, pp. 65–72, 2005.
- [11] A. Mallinger *et al.*, "Discovery of potent, orally bioavailable, small-molecule inhibitors of WNT signaling from a cell-based pathway screen," *J. Med. Chem.*, vol. 58, no. 4, pp. 1717–1735, 2015.
- [12] B. Al-Lazikani, U. Banerji, and P. Workman, "Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era," *Nat. Biotechnol.*, vol. 30, no. 7, pp. 679–692, 2012.
- [13] N. Normanno *et al.*, "Cooperative inhibitory effect of ZD1839 (Iressa) in combination with trastuzumab (Herceptin) on human breast cancer cell growth," *Ann. Oncol.*, vol. 13, no. 1, pp. 65–72, 2002.
- [14] S. L. Moulder, F. M. Yakes, S. K. Muthuswamy, R. Bianco, J. F. Simpson, and C. L. Arteaga, "Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo," *Cancer Res.*, vol. 61, no. 24, pp. 8887–8895, 2001.
- [15] R. M. Bukowski *et al.*, "Randomized phase II study of erlotinib combined with bevacizumab compared with bevacizumab alone in metastatic renal cell cancer," *J. Clin. Oncol.*, vol. 25, no. 29, pp. 4536–4541, 2007.
- [16] C. L. Arteaga *et al.*, "A phase I-II study of combined blockade of the ErbB receptor network with trastuzumab and gefitinib in patients with HER2 (ErbB2)-overexpressing metastatic breast cancer," *Clin. Cancer Res.*, vol. 14, no. 19, pp. 6277–6283, 2008.
- [17] J. Tol *et al.*, "Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer," *N. Engl. J. Med.*, vol. 360, no. 6, pp. 563–572, 2009.
- [18] J. D. Wolchok *et al.*, "Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma," *N. Engl. J. Med.*, p. NEJMoA1709684, 2017.
- [19] A. Manuscript, "Polypharmacology: drug discovery for the future," *Expert Rev. Clin. Pharmacol.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–13, 2014.
- [20] A. L. Hopkins, "Network pharmacology: The next paradigm in drug discovery," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 4, no. 11, pp. 682–690, 2008.
- [21] Z. A. Knight, H. Lin, and K. M. Shokat, "Targeting the cancer kinome through polypharmacology," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 10, no. 2, p. 130, 2010.
- [22] Z. A. Knight, H. Lin, and K. M. Shokat, "Targeting the cancer kinome through polypharmacology," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 10, no. 2, pp. 130–137, 2010.
- [23] P. Cohen and D. R. Alessi, "Kinase Drug Discovery – What 's Next in the Field?," *ACS Chem Biol*, vol. 8, no. 1, pp. 96–104, 2013.
- [24] R. Bianco, D. Melisi, F. Ciardiello, and G. Tortora, "Key cancer cell signal transduction pathways as therapeutic targets," *Eur. J. Cancer*, vol. 42, no. 3, pp. 290–294, 2006.
- [25] P. Cohen, "Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century?," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 1, no. April, pp. 309–315, 2002.
- [26] F. M. Ferguson and N. S. Gray, "Kinase inhibitors: the road ahead," *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2018.
- [27] Q. Liu *et al.*, "Developing irreversible inhibitors of the protein kinase cysteinome," *Chem. Biol.*, vol. 20, no. 2, pp. 146–159, 2013.

- [28] S. S. C. Manning, D.B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, "The Protein Kinase Complement of the Human Genome: EMBASEhost," *Sciencemag.Org*, vol. 298, no. 5600, pp. 1912–1934, 2002.
- [29] R. Roskoski, "Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes," *Pharmacol. Res.*, vol. 103, pp. 26–48, 2016.
- [30] T. Kondo *et al.*, "Philadelphia chromosome-positive acute myeloid leukemia (Ph + AML) treated with imatinib mesylate (IM). A report with IM plasma concentration and bcr-abl transcripts," *Leuk. Res.*, vol. 33, no. 9, pp. 137–138, 2009.
- [31] M. E. Gorre, M. Mohammed, K. Ellwood, N. Hsu, P. N. Rao, and C. L. Sawyers, "linking Clinical Resistance to STI-571 Cancer Therapy Caused by Gene Mutation or BCR-ABL Amplification," *Adv. Sci.*, vol. 293, no. 5531, pp. 876–880, 2010.
- [32] S. Duensing and A. Duensing, "Targeted therapies of gastrointestinal stromal tumors (GIST)-The next frontiers," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 80, no. 5, pp. 575–583, 2010.
- [33] C. Villicaña, G. Cruz, and M. Zurita, "The basal transcription machinery as a target for cancer therapy," 2014.
- [34] J. Bancerek *et al.*, "CDK8 Kinase Phosphorylates Transcription Factor STAT1 to Selectively Regulate the Interferon Response," *Immunity*, vol. 38, no. 2, pp. 250–262, 2013.
- [35] R. Roskoski, "Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes," *Pharmacol. Res.*, vol. 103, pp. 26–48, 2016.
- [36] M. B. H. Clevers, "linking colorectal cancer to Wnt signaling pathway," *Cell*, vol. 103, pp. 311–320, 2000.
- [37] J. E. Bradner, D. Hnisz, and R. A. Young, "Transcriptional Addiction in Cancer," *Cell*, vol. 168, no. 4, pp. 629–643, 2017.
- [38] C. Koumenis and A. Giaccia, "Transformed cells require continuous activity of RNA polymerase II to resist oncogene-induced apoptosis," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 17, no. 12, pp. 7306–7316, 1997.
- [39] M. J. Bywater *et al.*, "Inhibition of RNA polymerase I as therapeutic strategy to promote cancer specific activation of p53," vol. 22, no. 1, pp. 51–65, 2013.
- [40] T. Rzymiski, M. Mikula, K. Wiklik, and K. Brzózka, "CDK8 kinase - An emerging target in targeted cancer therapy," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1854, no. 10, pp. 1617–1629, 2015.
- [41] M. D. Galbraith *et al.*, "XHIF1A employs CDK8-mediator to stimulate RNAPII elongation in response to hypoxia," *Cell*, vol. 153, no. 6, pp. 1327–1339, 2013.
- [42] R. C. Conaway and J. W. Conaway, "Function and regulation of the Mediator complex," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 21, no. 2, pp. 225–230, 2011.
- [43] R. D. Kornberg, "Mediator and the mechanism of transcriptional activation," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 30, no. 5, pp. 235–239, 2005.
- [44] J. Hsin and J. L. Manley, "The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing," *Genes Dev.*, pp. 2119–2137, 2012.
- [45] D. Gonzalez *et al.*, "Suppression of Mediator is regulated by Cdk8-dependent Grr1 turnover of the Med3 coactivator," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, no. 7, pp. 2500–2505, 2014.
- [46] R. Pinhero, P. Liaw, K. Bertens, and K. Yankulov, "Three cyclin-dependent kinases preferentially phosphorylate different parts of the C-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II," *Eur. J. Biochem.*, vol. 271, no. 5, pp. 1004–1014, 2004.
- [47] A. J. Donner, C. C. Ebmeier, D. J. Taatjes, and J. M. Espinosa, "CDK8 is a positive regulator of transcriptional elongation within the serum response network," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 17, no. 2, pp. 194–201, 2010.
- [48] J. P. Tassan, M. Jaquenoud, P. Leopold, S. J. Schultz, and E. A. Nigg, "Identification of human cyclin-dependent kinase 8, a putative protein kinase partner for cyclin C," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 92, no. 19, pp. 8871–8875, 1995.
- [49] V. Leclerc, J. P. Tassan, P. H. O'Farrell, E. A. Nigg, and P. Léopold, "Drosophila Cdk8, a kinase partner of cyclin C that interacts with the large subunit of RNA polymerase II," *Mol. Biol. Cell*, vol. 7, no. 4, pp. 505–513, 1996.
- [50] T. Westerling, E. Kuuluvainen, and T. P. Makela, "Cdk8 Is Essential for Preimplantation Mouse Development," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, no. 17, pp. 6177–6182, 2007.
- [51] M. L. McClelland *et al.*, "Cdk8 deletion in the ApcMin murine tumour model represses EZH2 activity and accelerates tumorigenesis," *J. Pathol.*, vol. 237, no. 4, pp. 508–519, 2015.
- [52] R. C. Conaway, S. Sato, C. Tomomori-Sato, T. Yao, and J. W. Conaway, "The mammalian Mediator complex and its role in transcriptional regulation," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 30, no. 5, pp. 250–255, 2005.
- [53] A. D. Clark, M. Oldenbroek, and T. G. Boyer, "Mediator kinase module and human tumorigenesis," *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 50, no. 5, pp. 393–426, 2015.
- [54] A. D. Clark, M. Oldenbroek, and T. G. Boyer, "Mediator kinase module and human tumorigenesis,"

- Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 50, no. 5, pp. 393–426, 2015.
- [55] Z. C. Poss, C. C. Ebmeier, and D. J. Taatjes, “The Mediator complex and transcription regulation,” *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 48, no. 6, pp. 575–608, 2013.
- [56] R. Strich and K. F. Cooper, “The dual role of cyclin C connects stress regulated gene expression to mitochondrial dynamics,” *Microb. Cell*, vol. 1, no. 10, p. 318, 2014.
- [57] P. Rickert, J. L. Corden, and E. Lees, “Cyclin C/CDK8 and cyclin H/CDK7/p36 are biochemically distinct CTD kinases,” *Oncogene*, vol. 18, no. 4, pp. 1093–1102, 1999.
- [58] M. T. Knuesel, K. D. Meyer, C. Bernecky, and D. J. Taatjes, “The human CDK8 subcomplex is a molecular switch that controls Mediator coactivator function,” *Genes Dev.*, vol. 23, no. 4, pp. 439–451, 2009.
- [59] A. J. Donner, C. C. Ebmeier, D. J. Taatjes, and J. M. Espinosa, “CDK8 is a positive regulator of transcriptional elongation within the serum response network,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 17, no. 2, p. 194, 2010.
- [60] C. Alarcón *et al.*, “Nuclear CDKs Drive Smad Transcriptional Activation and Turnover in BMP and TGF- β Pathways,” *Cell*, vol. 139, no. 4, pp. 757–769, 2009.
- [61] C. J. Fryer, J. B. White, and K. A. Jones, “Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover,” *Mol. Cell*, vol. 16, no. 4, pp. 509–520, 2004.
- [62] X. Zhao *et al.*, “Regulation of lipogenesis by cyclin-dependent kinase 8 - Mediated control of SREBP-1,” *J. Clin. Invest.*, vol. 122, no. 7, pp. 2417–2427, 2012.
- [63] K. D. Meyer, A. J. Donner, M. T. Knuesel, A. G. York, J. M. Espinosa, and D. J. Taatjes, “Cooperative activity of cdk8 and GCN5L within Mediator directs tandem phosphoacetylation of histone H3,” *EMBO J.*, vol. 27, no. 10, pp. 1447–1457, 2008.
- [64] A. Zippo, R. Serafini, M. Rocchigiani, S. Pennacchini, A. Krepelova, and S. Oliviero, “Histone crosstalk between H3S10ph and H4K16ac generates a histone code that mediates transcription elongation,” *Cell*, vol. 138, no. 6, pp. 1122–1136, 2009.
- [65] M. Malumbres *et al.*, “Cyclin-dependent kinases : a family portrait,” vol. 11, no. 11, pp. 1275–1276, 2010.
- [66] I. Neganova and M. Lako, “G1 to S phase cell cycle transition in somatic and embryonic stem cells,” *J. Anat.*, vol. 213, no. 1, pp. 30–44, 2008.
- [67] A. J. Donner, S. Szostek, J. M. Hoover, and J. M. Espinosa, “CDK8 Is a Stimulus-Specific Positive Coregulator of p53 Target Genes,” *Mol. Cell*, vol. 27, no. 1, pp. 121–133, 2007.
- [68] D. C. Porter *et al.*, “Cyclin-dependent kinase 8 mediates chemotherapy-induced tumor-promoting paracrine activities,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, no. 34, pp. 13799–13804, 2012.
- [69] S. Kim, X. Xu, A. Hecht, and T. G. Boyer, “Mediator is a transducer of Wnt/ β -catenin signaling,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 20, pp. 14066–14075, 2006.
- [70] E. J. Morris *et al.*, “E2F1 represses β -catenin transcription and is antagonized by both pRB and CDK8,” *Nature*, vol. 455, no. 7212, pp. 552–556, 2008.
- [71] K. Nakayama *et al.*, “Skp2-Mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis,” *Dev. Cell*, vol. 6, no. 5, pp. 661–672, 2004.
- [72] D. Xu *et al.*, “Skp2-MacroH2A1-CDK8 axis orchestrates G2/M transition and tumorigenesis,” *Nat. Commun.*, vol. 6, 2015.
- [73] N. J. Topham and E. W. Hewitt, “Natural killer cell cytotoxicity: How do they pull the trigger?,” *Immunology*, vol. 128, no. 1, pp. 7–15, 2009.
- [74] E. M. Putz *et al.*, “CDK8-mediated STAT1-S727 phosphorylation restrains NK cell cytotoxicity and tumor surveillance,” *Cell Rep.*, vol. 4, no. 3, pp. 437–444, 2013.
- [75] J. Staab, C. Herrmann-Lingen, and T. Meyer, “CDK8 as the STAT1 serine 727 kinase?,” *Jak-Stat*, vol. 2, no. 3, p. e24275, 2013.
- [76] D. L. Daniels *et al.*, “Mutual exclusivity of MED12/MED12L, MED13/13L, and CDK8/19 paralogs revealed within the CDK-Mediator kinase module,” *J Proteomics Bioinform S*, vol. 2, no. 2, 2013.
- [77] M. Malumbres and M. Barbacid, “Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm,” *Nat. Rev. cancer*, vol. 9, no. 3, p. 153, 2009.
- [78] G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, and S. Sudarsanam, “The protein kinase complement of the human genome,” *Science (80-.)*, vol. 298, no. 5600, pp. 1912–1934, 2002.
- [79] T. Tsutsui, R. Fukasawa, A. Tanaka, Y. Hirose, and Y. Ohkuma, “Identification of target genes for the CDK subunits of the Mediator complex,” *Genes to Cells*, vol. 16, no. 12, pp. 1208–1218, 2011.
- [80] N. Li *et al.*, “Cyclin C is a haploinsufficient tumour suppressor,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 16, no. 11, pp. 1080–1091, 2014.
- [81] T. Tsutsui, H. Umemura, A. Tanaka, F. Mizuki, Y. Hirose, and Y. Ohkuma, “Human mediator kinase subunit CDK11 plays a negative role in viral activator VP16-dependent transcriptional regulation,” *Genes to Cells*, vol. 13, no. 8, pp. 817–826, 2008.

- [82] M. J. Park *et al.*, "Oncogenic exon 2 mutations in Mediator subunit MED12 disrupt allosteric activation of cyclin C-CDK8/19," *J. Biol. Chem.*, vol. 293, no. 13, pp. 4870–4882, 2018.
- [83] T. Tsutsui *et al.*, "Mediator complex recruits epigenetic regulators via its two cyclin-dependent kinase subunits to repress transcription of immune response genes," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 29, pp. 20955–20965, 2013.
- [84] K. A. Audetat *et al.*, "A Kinase-Independent Role for Cyclin-Dependent Kinase 19 in p53 Response," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 37, no. 13, pp. e00626-16, 2017.
- [85] M. D. Galbraith, A. J. Donner, and J. M. Espinosa, "CDK8: a positive regulator of transcription.," *Transcription*, vol. 1, no. 1, pp. 4–12, 2010.
- [86] W. song Cai *et al.*, "Downregulation of CDK-8 inhibits colon cancer hepatic metastasis by regulating Wnt/ β -catenin pathway," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 74, pp. 153–157, 2015.
- [87] R. Firestein *et al.*, "CDK8 expression in 470 colorectal cancers in relation to β -catenin activation, other molecular alterations and patient survival," *Int. J. Cancer*, vol. 126, no. 12, pp. 2863–2873, 2010.
- [88] H. Brenner, M. Kloor, and C. P. Pox, "Colorectal cancer," *Lancet*, vol. 383, no. 9927, pp. 1490–1502, 2014.
- [89] E. Aleem and R. J. Arceci, "Targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 3, no. April, pp. 1–22, 2015.
- [90] J. Crown, "CDK8: a new breast cancer target," *Oncotarget*, vol. 8, no. 9, pp. 1–2, 2017.
- [91] M. Chen *et al.*, "CDK8/19 Mediator kinases potentiate induction of transcription by NF κ B," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 114, no. 38, pp. 10208–10213, 2017.
- [92] O. J. Sansom *et al.*, "Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine," *Nature*, vol. 446, no. 7136, pp. 676–679, 2007.
- [93] T. Brabletz, K. Herrmann, A. Jung, G. Faller, and T. Kirchner, "Expression of nuclear beta-catenin and c-myc is correlated with tumor size but not with proliferative activity of colorectal adenomas.," *Am. J. Pathol.*, vol. 156, no. 3, pp. 865–70, 2000.
- [94] R. Firestein *et al.*, "CDK8 is a colorectal cancer oncogene that regulates β -catenin activity," *Nature*, vol. 455, no. 7212, pp. 547–551, 2008.
- [95] T. Dale *et al.*, "A selective chemical probe for exploring the role of CDK8 and CDK19 in human disease," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 11, no. 12, pp. 973–980, 2015.
- [96] J. Zhao, R. Ramos, and M. Demma, "CDK8 regulates E2F1 transcriptional activity through S375 phosphorylation," *Oncogene*, vol. 32, no. 30, pp. 3520–3530, 2013.
- [97] E. Lim, O. Metzger-Filho, and E. P. Winer, "The natural history of hormone receptor-positive breast cancer," *Oncology*, vol. 26, no. 8, p. 688–694, 2012.
- [98] M. S. J. McDermott *et al.*, "Inhibition of CDK8 mediator kinase suppresses estrogen dependent transcription and the growth of estrogen receptor positive breast cancer," *Oncotarget*, vol. 8, no. 8, pp. 12558–12575, 2017.
- [99] F. Lumachi, A. Brunello, M. Maruzzo, U. Basso, and S. Basso, "Treatment of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer," *Curr. Med. Chem.*, vol. 20, no. 5, pp. 596–604, 2013.
- [100] A. Serrao *et al.*, "Mediator kinase CDK8/CDK19 drives YAP1-dependent BMP4-induced EMT in cancer," *Oncogene*, pp. 1–17, 2018.
- [101] H. E. Pelish *et al.*, "Mediator kinase inhibition further activates super-enhancer-associated genes in AML," *Nature*, vol. 526, no. 7572, pp. 273–276, 2015.
- [102] T. Rzymiski *et al.*, "SEL120-34A is a novel CDK8 inhibitor active in AML cells with high levels of serine phosphorylation of STAT1 and STAT5 transactivation domains," *Oncotarget*, vol. 8, no. 20, 2017.
- [103] S. Sengupta and R. E. George, "Super-Enhancer-Driven Transcriptional Dependencies in Cancer," *Trends in Cancer*, vol. 3, no. 4, pp. 269–281, 2017.
- [104] A. Kapoor *et al.*, "The histone variant macroH2A suppresses melanoma progression through regulation of CDK8," *Nature*, vol. 468, no. 7327, pp. 1105–1111, 2010.
- [105] M. Buschbeck *et al.*, "The histone variant macroH2A is an epigenetic regulator of key developmental genes," *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 16, no. 10, pp. 1074–1079, 2009.
- [106] G. V Petukhova *et al.*, "NIH Public Access," *Int. J.*, vol. 466, no. 7304, pp. 1787–1797, 2011.
- [107] M. Huse and J. Kuriyan, "The Conformational Plasticity of Protein Kinases," *Cell*, vol. 109, pp. 1–8, 2011.
- [108] S. K. Hanks, "Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily :," *Genome Biol.*, vol. 4, no. 11, 2003.
- [109] S. K. Hanks, "Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective," *Genome Biol.*, vol. 4, no. 5, p. 111, 2003.
- [110] J. A. Endicott, M. E. M. Noble, and L. N. Johnson, "The structural basis for control of eukaryotic protein kinases," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 81, pp. 587–613, 2012.

- [111] S. R. Whittaker, A. Mallinger, P. Workman, and P. A. Clarke, "Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics," *Pharmacol. Ther.*, vol. 173, pp. 83–105, 2017.
- [112] E. V. Schneider, J. Böttcher, M. Blaesse, L. Neumann, R. Huber, and K. Maskos, "The structure of CDK8/CycC implicates specificity in the CDK/cyclin family and reveals interaction with a deep pocket binder," *J. Mol. Biol.*, vol. 412, no. 2, pp. 251–266, 2011.
- [113] K. C. Duong and J. R. Peterson, "The human kinome and kinase inhibition," *Curr. Protoc. Pharmacol.*, pp. 2–9, 2013.
- [114] G. Lolli, "Structural dissection of cyclin dependent kinases regulation and protein recognition properties," *Cell Cycle*, vol. 9, no. 8, pp. 1551–1561, 2010.
- [115] E. V. Schneider, J. Böttcher, M. Blaesse, L. Neumann, R. Huber, and K. Maskos, "The structure of CDK8/CycC implicates specificity in the CDK/cyclin family and reveals interaction with a deep pocket binder," *J. Mol. Biol.*, vol. 412, no. 2, pp. 251–266, 2011.
- [116] T. Anastassiadis, S. W. Deacon, K. Devarajan, H. Ma, and J. R. Peterson, "Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity," *Nat. Biotechnol.*, vol. 29, no. 11, p. 1039, 2011.
- [117] Y. Liu and N. S. Gray, "Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 2, no. 7, pp. 358–364, 2006.
- [118] F. Zuccotto, E. Ardini, E. Casale, and M. Angiolini, "Through the 'gatekeeper door': Exploiting the active kinase conformation," *J. Med. Chem.*, vol. 53, no. 7, pp. 2681–2694, 2010.
- [119] N. S. G. Zheng Zhao, Hong Wu, Li Wang, Yi Liu, Stefan Knapp, "Exploration of Type II Binding Mode: A Privileged Approach for," *ACS Chem. Biol.*, vol. 9, pp. 123–1241, 2014.
- [120] L. Garuti, M. Roberti, and G. Bottegoni, "Non-ATP competitive protein kinase inhibitors," *Curr. Med. Chem.*, vol. 17, no. 25, pp. 2804–2821, 2010.
- [121] J. Singh, R. C. Petter, and A. F. Kluge, "Targeted covalent drugs of the kinase family," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 14, no. 4, pp. 475–480, 2010.
- [122] T. Barf and A. Kaptein, "Irreversible protein kinase inhibitors: balancing the benefits and risks," *J. Med. Chem.*, vol. 55, no. 14, pp. 6243–6262, 2012.
- [123] J. Fujimoto *et al.*, "Studies of CDK 8/19 inhibitors: Discovery of novel and selective CDK8/19 dual inhibitors and elimination of their CYP3A4 time-dependent inhibition potential," *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 25, no. 12, pp. 3018–3033, 2017.
- [124] S. Philip, M. Kumarasiri, T. Teo, M. Yu, and S. Wang, "Cyclin-Dependent Kinase 8: A New Hope in Targeted Cancer Therapy?," *J. Med. Chem.*, p. acs.jmedchem.7b00901, 2017.
- [125] L. Johannessen *et al.*, "Small-molecule studies identify CDK8 as a regulator of IL-10 in myeloid cells," *Nat. Chem. Biol.*, vol. 13, no. 10, pp. 1102–1108, 2017.
- [126] V. J. Cee, D. Y. K. Chen, M. R. Lee, and K. C. Nicolaou, "Cortistatin A is a high-affinity ligand of protein kinases ROCK, CDK8, and CDK11," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 48, no. 47, pp. 8952–8957, 2009.
- [127] I. B. ROBINSON, D. C. PORTER, and M. P. Wentland, "CDK8/CDK19 selective inhibitors and their use in anti-metastatic and chemopreventative methods for cancer." Google Patents, 2013.
- [128] S. E. Wardell, J. R. Marks, and D. P. McDonnell, "The turnover of estrogen receptor α by the selective estrogen receptor degrader (SERD) fulvestrant is a saturable process that is not required for antagonist efficacy," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 82, no. 2, pp. 122–130, 2011.
- [129] A. Mallinger *et al.*, "Discovery of potent, selective, and orally bioavailable small-molecule modulators of the mediator complex-associated kinases CDK8 and CDK19," *J. Med. Chem.*, vol. 59, no. 3, pp. 1078–1101, 2016.
- [130] P. Czodrowski *et al.*, "Structure-Based Optimization of Potent, Selective, and Orally Bioavailable CDK8 Inhibitors Discovered by High-Throughput Screening," *J. Med. Chem.*, vol. 59, no. 20, pp. 9337–9349, 2016.
- [131] A. Mallinger *et al.*, "2, 8-Disubstituted-1, 6-naphthyridines and 4, 6-disubstituted-isoquinolines with potent, selective affinity for CDK8/19," *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 7, no. 6, pp. 573–578, 2016.
- [132] P. A. Clarke *et al.*, "Assessing the Mechanism and Therapeutic Potential of Modulators of the Human Mediator Complex-Associated Protein Kinases," vol. 8, pp. 1–25, 2016.
- [133] A. Mallinger *et al.*, "2,8-Disubstituted-1,6-Naphthyridines and 4,6-Disubstituted-Isoquinolines with Potent, Selective Affinity for CDK8/19," *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 7, no. 6, pp. 573–578, 2016.
- [134] K. Schiemann *et al.*, "Discovery of potent and selective CDK8 inhibitors from an HSP90 pharmacophore," *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 26, no. 5, pp. 1443–1451, 2016.
- [135] M. F. T. Koehler *et al.*, "Development of a Potent, Specific CDK8 Kinase Inhibitor Which Phenocopies CDK8/19 Knockout Cells," *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 7, no. 3, pp. 223–228, 2016.
- [136] K. Ono *et al.*, "Design and synthesis of selective CDK8/19 dual inhibitors: discovery of 4, 5-dihydrothieno [3', 4': 3, 4] benzo [1, 2-d] isothiazole derivatives," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 25, no. 8,

- pp. 2336–2350, 2017.
- [137] A. Nakamura, D. Nakata, Y. Kakoi, and M. Kunitomo, “CDK8 / 19 inhibition induces premature G1 / S transition and ATR- dependent cell death in prostate cancer cells,” vol. 9, no. 17, pp. 13474–13487, 2018.
 - [138] X. Han *et al.*, “Discovery of potent and selective CDK8 inhibitors through FBDD approach,” *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, vol. 27, no. 18, pp. 4488–4492, 2017.
 - [139] T. Wang *et al.*, “Discovery of novel CDK8 inhibitors using multiple crystal structures in docking-based virtual screening,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 129, pp. 275–286, 2017.
 - [140] M. Kumarasiri *et al.*, “In Search of Novel CDK8 Inhibitors by Virtual Screening,” *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 57, no. 3, pp. 413–416, 2017.
 - [141] J. M. Hatcher, E. S. Wang, L. Johannessen, N. Kwiatkowski, T. Sim, and N. S. Gray, “Development of Highly Potent and Selective Steroidal Inhibitors and Degraders of CDK8,” *ACS Med. Chem. Lett.*, p. acsmedchemlett.8b00011, 2018.
 - [142] S. M. Wilhelm *et al.*, “BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis,” *Cancer Res.*, vol. 64, no. 19, pp. 7099–7109, 2004.
 - [143] W.-S. Huang *et al.*, “Discovery of 3-[2-(imidazo [1, 2-b] pyridazin-3-yl) ethynyl]-4-methyl-N-{4-[(4-methylpiperazin-1-yl) methyl]-3-(trifluoromethyl) phenyl} benzamide (AP24534), a potent, orally active pan-inhibitor of breakpoint cluster region-abelson (BCR-ABL) kinase inclu,” *J. Med. Chem.*, vol. 53, no. 12, pp. 4701–4719, 2010.
 - [144] T. Dale *et al.*, “Identification of a potent and selective chemical probe for exploring the role of Mediator complex-associated protein kinases CDK8 and CDK19 in human disease,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 11, pp. 973–980, 2015.
 - [145] D. H. Albert *et al.*, “Preclinical activity of ABT-869, a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor,” *Mol. Cancer Ther.*, vol. 5, no. 4, pp. 995–1006, 2006.
 - [146] P. Bergeron *et al.*, “Design and development of a series of potent and selective type II inhibitors of CDK8,” *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 7, no. 6, pp. 595–600, 2016.
 - [147] P. Bergeron *et al.*, “Design and Development of a Series of Potent and Selective Type II Inhibitors of CDK8,” *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 7, no. 6, pp. 595–600, 2016.
 - [148] J. Dai, S. Sultan, S. S. Taylor, and J. M. G. Higgins, “The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment,” *Genes Dev.*, vol. 19, no. 4, pp. 472–488, 2005.
 - [149] F. Wang, N. P. Ulyanova, M. S. van der Waal, D. Patnaik, S. M. A. Lens, and J. M. G. Higgins, “A positive feedback loop involving Haspin and Aurora B promotes CPC accumulation at centromeres in mitosis,” *Curr. Biol.*, vol. 21, no. 12, pp. 1061–1069, 2011.
 - [150] F. Wang *et al.*, “Histone H3 Thr-3 Phosphorylation at Centromeres in Mitosis,” *Science*, vol. 330, no. October, pp. 231–236, 2010.
 - [151] J. M. G. Higgins, “Haspin: a newly discovered regulator of mitotic chromosome behavior,” *Chromosoma*, vol. 119, no. 2, pp. 137–147, 2010.
 - [152] N. G. Amoussou, A. Bigot, C. Roussakis, and J. M. H. Robert, “Haspin: a promising target for the design of inhibitors as potent anticancer drugs,” *Drug Discov. Today*, vol. 23, no. 2, pp. 409–415, 2018.
 - [153] A. Maiolica *et al.*, “Modulation of the Chromatin Phosphoproteome by the Haspin Protein Kinase,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 13, no. 7, pp. 1724–1740, 2014.
 - [154] W. Kim *et al.*, “Macro histone H2A1.2 (MacroH2A1) protein suppresses mitotic kinase VRK1 during interphase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 8, pp. 5278–5289, 2012.
 - [155] F. Wang *et al.*, “Histone H3 Thr-3 Phosphorylation by Haspin Positions Aurora B at Centromeres in Mitosis,” *Science (80-)*, vol. 330, no. 6001, p. 231 LP-235, Oct. 2010.
 - [156] L. Zhou, X. Tian, C. Zhu, F. Wang, and J. M. Higgins, “Polo-like kinase-1 triggers Histone phosphorylation by Haspin in mitosis,” *EMBO Rep.*, vol. 15, no. 3, pp. 273–281, 2014.
 - [157] F. Villa *et al.*, “Crystal structure of the catalytic domain of Haspin, an atypical kinase implicated in chromatin organization,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 48, pp. 20204–9, 2009.
 - [158] C. Ghenoïu, M. S. Wheelock, and H. Funabiki, “Autoinhibition and Polo-dependent multisite phosphorylation restrict activity of the histone H3 kinase Haspin to mitosis,” *Mol. Cell*, vol. 52, no. 5, pp. 734–745, 2013.
 - [159] J. Dai, A. V. Kateneva, and J. M. G. Higgins, “Studies of haspin-depleted cells reveal that spindle-pole integrity in mitosis requires chromosome cohesion,” *J. Cell Sci.*, vol. 122, no. 22, pp. 4168–4176, 2009.
 - [160] A. De Antoni, S. Maffini, S. Knapp, A. Musacchio, and S. Santaguida, “A small-molecule inhibitor of Haspin alters the kinetochore functions of Aurora B,” *J. Cell Biol.*, vol. 199, no. 2, pp. 269–284, 2012.
 - [161] M. Carmena, M. Wheelock, H. Funabiki, and W. C. Earnshaw, “The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis,” *Nat. Rev. Mol. cell Biol.*, vol. 13, no. 12, p. 789,

- 2012.
- [162] S. Ruchaud, M. Carmena, and W. C. Earnshaw, "Chromosomal passengers: conducting cell division," *Nat. Rev. Mol. cell Biol.*, vol. 8, no. 10, p. 798, 2007.
 - [163] J. Dai, B. A. Sullivan, and J. M. G. Higgins, "Regulation of Mitotic Chromosome Cohesion by Haspin and Aurora B," *Dev. Cell*, vol. 11, no. 5, pp. 741–750, 2006.
 - [164] S. M. Quartuccio, S. S. Dipali, and K. Schindler, "Haspin inhibition reveals functional differences of interchromatid axis-localized AURKB and AURKC," *Mol. Biol. Cell*, vol. 28, no. 17, pp. 2233–2240, 2017.
 - [165] A. E. Kelly, C. Ghenoïu, J. Z. Xue, C. Zierhut, H. Kimura, and H. Funabiki, "Survivin Reads Phosphorylated Histone H3 Threonine 3 to Activate the Mitotic Kinase Aurora B," *Science (80-.)*, vol. 330, no. 6001, p. 235 LP-239, Oct. 2010.
 - [166] O. Feizbakhsh, M. Place, X. Fant, F. Buron, S. Routier, and S. Ruchaud, "The Mitotic Protein Kinase Haspin and Its Inhibitors," *Protein Phosphorylation*, 2017.
 - [167] M. Carretero, M. Ruiz-Torres, M. Rodríguez-Corsino, I. Barthelemy, and A. Losada, "Pds5B is required for cohesion establishment and Aurora B accumulation at centromeres," *EMBO J.*, vol. 32, no. 22, pp. 2938–2949, 2013.
 - [168] L. Zhou *et al.*, "The N-Terminal Non-Kinase-Domain-Mediated Binding of Haspin to Pds5B Protects Centromeric Cohesion in Mitosis," *Curr. Biol.*, vol. 27, no. 7, pp. 992–1004, 2017.
 - [169] M. Malumbres and M. Barbacid, "Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, no. 3, pp. 153–166, 2009.
 - [170] S. S. Dave *et al.*, "Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 354, no. 23, pp. 2431–2442, 2006.
 - [171] A. Rosenwald *et al.*, "Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia," *J. Exp. Med.*, vol. 194, no. 11, pp. 1639–1648, 2001.
 - [172] N. E. Bhola *et al.*, "Kinome-wide functional screen identifies role of PLK1 in hormone-independent, ER-positive breast cancer," *Cancer Res.*, 2014.
 - [173] H. Koch *et al.*, "Phosphoproteome profiling reveals molecular mechanisms of growth-factor-mediated kinase inhibitor resistance in EGFR-overexpressing cancer cells," *J. Proteome Res.*, vol. 15, no. 12, pp. 4490–4504, 2016.
 - [174] E. E. Huerta, "Cancer prevention in the 21st century: The Preventorium concept," *J. Health Care Poor Underserved*, vol. 23, no. 4, pp. 1698–1703, 2012.
 - [175] C. Dominguez-Brauer, K. L. Thu, J. M. Mason, H. Blaser, M. R. Bray, and T. W. Mak, "Targeting Mitosis in Cancer: Emerging Strategies," *Mol. Cell*, vol. 60, no. 4, pp. 524–536, 2015.
 - [176] E. Gornstein and T. L. Schwarz, "The paradox of paclitaxel neurotoxicity: Mechanisms and unanswered questions," *Neuropharmacology*, vol. 76, pp. 175–183, 2014.
 - [177] M. Kollareddy, D. Zheleva, P. Dzubak, P. S. Brahmikshatriya, M. Lepsik, and M. Hajduch, "Aurora kinase inhibitors: progress towards the clinic," *Invest. New Drugs*, vol. 30, no. 6, pp. 2411–2432, 2012.
 - [178] B. T. Gjertsen and P. Schöffski, "Discovery and development of the Polo-like kinase inhibitor volasertib in cancer therapy," *Leukemia*, vol. 29, no. 1, p. 11, 2015.
 - [179] J. Eswaran *et al.*, "Structure and functional characterization of the atypical human kinase haspin," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 48, pp. 20198–20203, 2009.
 - [180] J. M. G. Higgins, "Structure, function and evolution of haspin and haspinrelated proteins, a distinctive group of eukaryotic protein kinases," *Cell. Mol. Life Sci. C.*, vol. 60, no. 3, pp. 446–462, 2003.
 - [181] F. Villa *et al.*, "Crystal structure of the catalytic domain of Haspin, an atypical kinase implicated in chromatin organization," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 48, pp. 20204–20209, 2009.
 - [182] L. L. Wotring and L. B. Townsend, "Study of the Cytotoxicity and Metabolism of 4-Amino-3-carboxamido-1-(β -d-ribofuranosyl) pyrazolo [3, 4-d] pyrimidine Using Inhibitors of Adenosine Kinase and Adenosine Deaminase," *Cancer Res.*, vol. 39, no. 8, pp. 3018–3023, 1979.
 - [183] A. De Antoni, S. Maffini, S. Knapp, A. Musacchio, and S. Santaguida, "A small-molecule inhibitor of Haspin alters the kinetochore functions of Aurora B," *J Cell Biol*, vol. 199, no. 2, pp. 269–284, 2012.
 - [184] G. D. Cuny *et al.*, "Structure-activity relationship study of beta-carboline derivatives as haspin kinase inhibitors," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 22, no. 5, pp. 2015–2019, 2012.
 - [185] N. Göckler, G. Jofre, C. Papadopoulos, U. Soppa, F. J. Tejedor, and W. Becker, "Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation," *FEBS J.*, vol. 276, no. 21, pp. 6324–6337, 2009.
 - [186] Y. Ogawa *et al.*, "Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A," *Nat. Commun.*, vol. 1, p. 86, 2010.
 - [187] D. Patnaik, J. Xian, M. A. Glicksman, G. D. Cuny, R. L. Stein, and J. M. G. Higgins, "Identification of small molecule inhibitors of the mitotic kinase haspin by high-throughput screening using a homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer assay," *J. Biomol. Screen.*, vol. 13,

- no. 10, pp. 1025–1034, 2008.
- [188] G. D. Cuny *et al.*, “Structure–activity relationship study of acridine analogs as haspin and DYRK2 kinase inhibitors,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 20, no. 12, pp. 3491–3494, 2010.
- [189] K. Kestav, D. Lavogina, G. Raidaru, A. Chaikuad, S. Knapp, and A. Uri, “Bisubstrate inhibitor approach for targeting mitotic kinase Haspin,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 26, no. 2, pp. 225–234, 2015.
- [190] D. Huertas *et al.*, “Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of the histone kinase Haspin,” *Oncogene*, vol. 31, no. 11, p. 1408, 2012.
- [191] L. Han, P. Wang, Y. Sun, S. Liu, and J. Dai, “Anti-melanoma activities of haspin inhibitor CHR-6494 deployed as a single agent or in a synergistic combination with MEK inhibitor,” *J. Cancer*, vol. 8, no. 15, p. 2933, 2017.
- [192] C. Opoku-Temeng, N. Dayal, M. A. Soorashjani, and H. O. Sintim, “3H-pyrazolo [4, 3-f] quinoline haspin kinase inhibitors and anticancer properties,” *Bioorg. Chem.*, vol. 78, pp. 418–426, 2018.
- [193] B. C. Duffy, L. Zhu, H. Decornez, and D. B. Kitchen, “Early phase drug discovery: Cheminformatics and computational techniques in identifying lead series,” *Bioorganic Med. Chem.*, vol. 20, no. 18, pp. 5324–5342, 2012.
- [194] R. Macarron, “Critical review of the role of HTS in drug discovery,” *Drug Discov. Today*, vol. 11, no. 7–8, pp. 277–279, 2006.
- [195] I. Collins and P. Workman, “New approaches to molecular cancer therapeutics,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 2, no. 12, pp. 689–700, 2006.
- [196] B. Munos, “Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 8, no. 12, pp. 959–968, 2009.
- [197] S. K. Chanda and J. S. Caldwell, “Fulfilling the promise: drug discovery in the post-genomic era,” *Drug Discov. Today*, vol. 8, no. 4, pp. 168–174, 2003.
- [198] N. Brown, H. Zehender, K. Azzaoui, A. Schuffenhauer, L. M. Mayr, and E. Jacoby, “A chemoinformatics analysis of hit lists obtained from high-throughput affinity-selection screening,” *J. Biomol. Screen.*, vol. 11, no. 2, pp. 123–130, 2006.
- [199] H. Pérez-Sánchez, G. Cano, J. García-Rodríguez, and J. M. Cecilia, “Descubrimiento de fármacos basado en cribado virtual refinado con enfoques neuronales paralelos,” *Rev. Int. Metod. Numer. para Calc. y Disen. en Ing.*, vol. 31, no. 4, pp. 207–211, 2015.
- [200] M. J. Valler and D. Green, “Diversity screening versus focused screening in drug discovery,” *Drug Discov. Ther.*, vol. 5, no. 7, p. 286, 2000.
- [201] B. C. Doak, B. Over, F. Giordanetto, and J. Kihlberg, “Oral druggable space beyond the rule of 5: Insights from drugs and clinical candidates,” *Chem. Biol.*, vol. 21, no. 9, pp. 1115–1142, 2014.
- [202] F. Lombardo, R. S. Obach, M. Y. Shalaeva, and F. Gao, “Prediction of volume of distribution values in humans for neutral and basic drugs using physicochemical measurements and plasma protein binding data,” *J. Med. Chem.*, vol. 45, no. 13, pp. 2867–2876, 2002.
- [203] K. H. Bleicher, H. J. Böhm, K. Müller, and A. I. Alanine, “Hit and lead generation: Beyond high-throughput screening,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 2, no. 5, pp. 369–378, 2003.
- [204] K. H. Bleicher, H.-J. Böhm, K. Müller, and A. I. Alanine, “A guide to drug discovery: hit and lead generation: beyond high-throughput screening,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 2, no. 5, p. 369, 2003.
- [205] P. J. Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, “Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development setting,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 23, pp. 3–25, 1997.
- [206] J. P. Hughes, S. S. Rees, S. B. Kalindjian, and K. L. Philpott, “Principles of early drug discovery,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 162, no. 6, pp. 1239–1249, 2011.
- [207] C. Nantasenamat and V. Prachayasittikul, “Maximizing computational tools for successful drug discovery,” Taylor & Francis, 2015.
- [208] P. K. Vuppala, “Importance of ADME and Bioanalysis in the Drug Discovery,” *J. Bioequiv. Availab.*, vol. 5, no. 4, 2013.
- [209] H. van de Waterbeemd and E. Gifford, “ADMET in silico modelling: Towards prediction paradise?,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 2, no. 3, pp. 192–204, 2003.
- [210] A. Baumann, “Nonclinical development of biopharmaceuticals,” *Drug Discov. Today*, vol. 14, no. 23–24, pp. 1112–1122, 2009.
- [211] M. J. Waring *et al.*, “An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 14, no. 7, p. 475, 2015.
- [212] L. Lin and H. Wong, “Predicting oral drug absorption: Mini review on physiologically-based pharmacokinetic models,” *Pharmaceutics*, vol. 9, no. 4, 2017.
- [213] D. H. Ruiz *et al.*, “absorción de fármacos Variable complexity techniques for assessing drug absorption,” vol. 43, no. 1, pp. 18–32, 2012.
- [214] M. Kansy, F. Senner, and K. Gubernator, “Physicochemical high throughput screening: parallel artificial

- membrane permeation assay in the description of passive absorption processes,” *J. Med. Chem.*, vol. 41, no. 7, pp. 1007–1010, 1998.
- [215] K. W. W. and K. D. K. Daniel F. Veber, Stephen R. Johnson, Hung-Yuan Cheng, Brian R. Smith, “Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates,” *J. Med. Chem.*, vol. 45, pp. 2615–2623, 2002.
- [216] J. Wang and L. Urban, “The impact of early ADME profiling on drug discovery and development strategy,” *Drug Discov. World*, pp. 73–86, 2004.
- [217] B. J. Bennion *et al.*, “Predicting a Drug’s Membrane Permeability: A Computational Model Validated with in Vitro Permeability Assay Data,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 121, no. 20, pp. 5228–5237, 2017.
- [218] U. Norinder and C. A. S. Bergström, “Prediction of ADMET properties,” *ChemMedChem*, vol. 1, no. 9, pp. 920–937, 2006.
- [219] M. S. Alavijeh, M. Chishty, M. Z. Qaiser, and A. M. Palmer, “Drug metabolism and pharmacokinetics, the blood-brain barrier, and central nervous system drug discovery,” *NeuroRx*, vol. 2, no. 4, pp. 554–71, 2005.
- [220] L. R. A. Rougée, R. H. Richmond, and A. C. Collier, “Natural variations in xenobiotic-metabolizing enzymes: Developing tools for coral monitoring,” *Coral Reefs*, vol. 33, no. 2, pp. 523–535, 2014.
- [221] J. B. M. Ronsano, “Principios Básicos de la Farmacología Farmacocin,” *Pdf - Univ. Barcelona*.
- [222] S. J. Richardson, A. Bai, A. A. Kulkarni, and M. F. Moghaddam, “Efficiency in Drug Discovery: Liver S9 Fraction Assay As a Screen for Metabolic Stability,” *Drug Metab. Lett.*, vol. 10, no. 2, pp. 83–90, 2016.
- [223] N. Plant, “Strategies for using in vitro screens in drug metabolism,” *Drug Discov Today*, vol. 9, no. 7, pp. 328–336, 2004.
- [224] Y. Naritomi, S. Terashita, S. Kimura, A. Suzuki, A. Kagayama, and Y. Sugiyama, “Prediction of Human Hepatic Clearance From in Vivo Animal Experiments and in Vitro Metabolic Studies With Liver Microsomes From Animals and Humans Abstract :,” vol. 29, no. 10, pp. 1316–1324, 2001.
- [225] Q. Y. Zhang, C. Fang, J. Zhang, D. Dunbar, L. Kaminsky, and X. Ding, “An intestinal epithelium-specific cytochrome P450 (P450) reductase-knockout mouse model: Direct evidence for a role of intestinal P450s in first-pass clearance of oral nifedipine,” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 37, no. 3, pp. 651–657, 2009.
- [226] L. H. Cohen, M. J. Remley, D. Raunig, and A. D. N. Vaz, “In vitro drug interactions of cytochrome p450: An evaluation of fluorogenic to conventional substrates,” *Drug Metab. Dispos.*, vol. 31, no. 8, pp. 1005–1015, 2003.
- [227] U. Banerji and P. Workman, “Critical parameters in targeted drug development: the pharmacological audit trail,” *Semin. Oncol.*, vol. 43, no. 4, pp. 436–445, 2016.
- [228] M. C. Sanguinetti and M. Tristani-Firouzi, “hERG potassium channels and cardiac arrhythmia,” *Nature*, vol. 440, no. 7083, pp. 463–469, 2006.
- [229] G. a Gutman *et al.*, “International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Potassium Channels,” *Pharmacological Rev.*, vol. 55, no. 4, pp. 583–586, 2003.
- [230] F. Barros, P. Domínguez, A. Machín, and D. Peña, “ARTÍCULO DIVULGATIVO hERG : un canal de potasio implicado en el ritmo cardíaco y mucho más,” pp. 1–9.
- [231] D. R. Piper *et al.*, “Development of the Predictor hERG Fluorescence Polarization Assay Using a Membrane Protein Enrichment Approach,” *Assay Drug Dev. Technol.*, vol. 6, no. 2, pp. 213–223, 2008.
- [232] J. I. Vandenberg, M. D. Perry, M. J. Perrin, S. A. Mann, Y. Ke, and A. P. Hill, “hERG K⁺ Channels: Structure, Function, and Clinical Significance,” *Physiol. Rev.*, vol. 92, no. 3, pp. 1393–1478, 2012.
- [233] R. A. Copeland, “The drug-target residence time model: a 10-year retrospective,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 15, no. 2, pp. 87–95, 2016.
- [234] L. Neumann, K. Von Knig, and D. Ullmann, “HTS Reporter displacement assay for fragment screening and fragment evolution toward leads with optimized binding kinetics, binding selectivity, and thermodynamic signature,” *Methods Enzymol.*, vol. 493, pp. 299–320, 2011.
- [235] R. A. Copeland, “The dynamics of drug-target interactions: drug-target residence time and its impact on efficacy and safety,” *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 5, no. 4, pp. 305–310, 2010.
- [236] H. Lu and P. J. Tonge, “Drug-target residence time: Critical information for lead optimization,” *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 14, no. 4, pp. 467–474, 2010.
- [237] R. A. Copeland and A. J. Wiley, “Enzymes. A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis, Second ed. Robert A. Copeland,” *Anal. Biochem.*, vol. 291, no. 1, p. 172, 2001.
- [238] P. J. Tonge, “Drug-Target Kinetics in Drug Discovery,” *ACS Chem. Neurosci.*, vol. 9, no. 1, pp. 29–39, 2018.
- [239] R. A. Copeland, “Conformational adaptation in drug--target interactions and residence time,” *Future Med. Chem.*, vol. 3, no. 12, pp. 1491–1501, 2011.
- [240] P. J. Tummino and R. a Copeland, “Residence time of receptor-ligand complexes and its effect on

- biological function.," *Biochemistry*, vol. 47, no. 20, pp. 5481–92, 2008.
- [241] A. Schoop and F. Dey, "On-rate based optimization of structure-kinetic relationship - Surfing the kinetic map," *Drug Discov. Today Technol.*, vol. 17, pp. 9–15, 2015.
- [242] R. A. Copeland, D. L. Pompliano, and T. D. Meek, "Drug–target residence time and its implications for lead optimization," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 5, no. 9, pp. 730–739, 2006.
- [243] E. V. Schneider, J. Bottcher, R. Huber, K. Maskos, and L. Neumann, "Structure-kinetic relationship study of CDK8/CycC specific compounds," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 20, pp. 8081–8086, 2013.
- [244] R. A. Copeland, D. L. Pompliano, and T. D. Meek, "Drug–target residence time and its implications for lead optimization," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 5, no. 9, pp. 730–739, 2006.
- [245] D. C. Swinney, "Can binding kinetics translate to a clinically differentiated drug? From theory to practice," *Lett. Drug Des. Discov.*, vol. 3, no. 8, pp. 569–574, 2006.
- [246] D. Guo, J. M. Hillger, A. P. IJzerman, and L. H. Heitman, "Drug–Target Residence Time—A Case for G Protein–Coupled Receptors," *Med. Res. Rev.*, vol. 34, no. 4, pp. 856–892, 2014.
- [247] G. Dahl and T. Akerud, "Pharmacokinetics and the drug–target residence time concept," *Drug Discov. Today*, vol. 18, no. 15–16, pp. 697–707, 2013.
- [248] T. Cholko, W. Chen, Z. Tang, and C. en A. Chang, "A molecular dynamics investigation of CDK8/CycC and ligand binding: conformational flexibility and implication in drug discovery," *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, no. 123456789, pp. 1–15, 2018.
- [249] B. Córscico, L. J. Falomir Lockhart, G. R. Franchini, and N. Scaglia, *Análisis estructural y funcional de Macromoléculas*. 2013.
- [250] R. A. Copeland, A. Basavapathruni, M. Moyer, and M. P. Scott, "Impact of enzyme concentration and residence time on apparent activity recovery in jump dilution analysis," *Anal. Biochem.*, vol. 416, no. 2, pp. 206–210, 2011.
- [251] F. Schiele, P. Ayaz, and A. Fernández-Montalván, "A universal homogeneous assay for high-throughput determination of binding kinetics," *Anal. Biochem.*, vol. 468, pp. 42–49, 2015.
- [252] E. C. Hulme and M. A. Trevethick, "Ligand binding assays at equilibrium: Validation and interpretation," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 161, no. 6, pp. 1219–1237, 2010.
- [253] C. Alli, "Nerviano Medical Sciences. ADP-Glo: The new luminescent ADP detection assay as a universal, quantitative and robust alternative for kinase profiling. Poster# P3016," *Soc. Biomol. Sci.*, 2009.
- [254] Y. Jia, C. M. Quinn, S. Kwak, and R. V. Talanian, "Current in vitro kinase assay technologies: the quest for a universal format," *Curr. Drug Discov. Technol.*, vol. 5, no. 1, pp. 59–69, 2008.
- [255] G. Németh *et al.*, "Novel, selective CDK9 inhibitors for the treatment of HIV infection," *Curr. Med. Chem.*, vol. 18, no. 3, pp. 342–358, 2011.
- [256] "ZHANG_FACTO_Z.pdf." .
- [257] J.-H. Zhang, T. D. Y. Chung, and K. R. Oldenburg, "A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays," *J. Biomol. Screen.*, vol. 4, no. 2, pp. 67–73, 1999.
- [258] "JI-HU ZHANG, THOMAS D STATISTICAL PARÁMETER.pdf." .
- [259] R. A. Copeland, *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*, vol. 53, no. 9. 2013.
- [260] P. Newton, P. Harrison, and S. Clulow, "A novel method for determination of the affinity of protein: protein interactions in homogeneous assays," *J. Biomol. Screen.*, vol. 13, no. 7, pp. 674–682, 2008.
- [261] R. A. Copeland, *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, vol. 53, no. 9. 2013.
- [262] D. A. Craig, "The Cheng-Prusoff relationship: something lost in the translation," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 14, no. 3, pp. 89–91, 1993.
- [263] Y. Chen and W. Prusoff, "Relationship between the inhibition constant and the concentration of an inhibitor that cause a 50% inhibition of an enzyme reaction," *Biochem Pharmacol*, vol. 22, pp. 3099–3108, 1973.
- [264] R. a Copeland, *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug*. 2005.
- [265] L. Format, B. Marks, C. Lebakken, S. Riddle, R. Somberg, and S. Hereley, "Determination of Drug-Kinase Residence Time in a," *Time*, pp. 53719–53719.
- [266] E. R. Wood *et al.*, "A Unique Structure for Epidermal Growth Factor Receptor Bound to GW572016 (Lapatinib)," *Cancer Res.*, vol. 64, no. 18, pp. 6652–6659, 2004.
- [267] J. L. Castillo *et al.*, "[Factors that affect DNA content analysis by flow cytometry].," *Rev. Med. Chil.*, vol. 127, no. 11, pp. 1385–97, 1999.
- [268] I. J. Hidalgo, "Assessing the absorption of new pharmaceuticals," *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 1, no. 5, pp. 385–401, 2001.
- [269] B. Jablonski, "Anisotropic filtering of multidimensional rotational trajectories as a generalization of 2D diffusion process," *Multidimens. Syst. Signal Process.*, vol. 19, no. 3–4, pp. 379–399, 2008.

- [270] S. C. Khojasteh, H. Wong, and C. E. C. A. Hop, *Drug metabolism and pharmacokinetics quick guide*. Springer Science & Business Media, 2011.
- [271] S. A. Waldman and A. Terzic, "Pharmacology and Therapeutics: Principles to Practice," p. Section 2, 2009.
- [272] M. Malumbres *et al.*, "Cyclin-dependent kinases," *Genome Biol.*, vol. 15, no. 6, p. 122, 2014.
- [273] C. S. Lebakken *et al.*, "Development and applications of a broad-coverage, TR-FRET-based kinase binding assay platform," *J. Biomol. Screen.*, vol. 14, no. 8, pp. 924–935, 2009.
- [274] C. J. Chou, D. Herman, and J. M. Gottesfeld, "Pimelic diphenylamide 106 is a slow, tight-binding inhibitor of class I histone deacetylases," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 51, pp. 35402–35409, 2008.
- [275] R. A. Copeland, "The dynamics of drug-target interactions: drug-target residence time and its impact on efficacy and safety.," *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 5, no. 4, pp. 305–10, 2010.
- [276] E. V Schneider, "Structural and functional characterization of human protein kinases exemplified on the human cyclin-dependent kinase 8 / cyclin C complex," *Tech. Univ. München*, p. 123, 2012.
- [277] H. E. Pelish and *et al.*, "Mediator Kinase Inhibition Further Activates Super-Enhancer Associated Genes in AML," *Nature*, vol. 526, no. 7572, pp. 273–276, 2015.
- [278] H. J. Motulsky and L. C. Mahan, "The kinetics of competitive radioligand binding predicted by the law of mass action.," *Mol. Pharmacol.*, vol. 25, pp. 1–9, 1984.
- [279] M. Malumbres, "Cyclin-dependent kinases," *Genome Biol.*, vol. 15, no. 6, p. 122, 2014.
- [280] P. A. Clarke *et al.*, "Assessing the mechanism and therapeutic potential of modulators of the human Mediator complex-associated protein kinases," *Elife*, vol. 5, p. e20722, 2016.
- [281] M. Vilums *et al.*, "Structure–kinetic relationships□ an overlooked parameter in hit-to-lead optimization: a case of cyclopentylamines as chemokine receptor 2 antagonists," *J. Med. Chem.*, vol. 56, no. 19, pp. 7706–7714, 2013.
- [282] D. M. Colleluori and D. E. Ash, "Classical and slow-binding inhibitors of human type II arginase," *Biochemistry*, vol. 40, no. 31, pp. 9356–9362, 2001.
- [283] M. Vilums *et al.*, "Structure-kinetic relationships - An overlooked parameter in hit-to-lead optimization: A case of cyclopentylamines as chemokine receptor 2 antagonists," *J. Med. Chem.*, vol. 56, no. 19, pp. 7706–7714, 2013.
- [284] A. Schoop and F. Dey, "On-rate based optimization of structure - kinetic relationship-surfing the kinetic map," *Drug Discov. today. Technol.*, vol. 17, pp. 9–15, 2015.
- [285] R. R. Kroe *et al.*, "Thermal denaturation: A method to rank slow binding, high-affinity P38 α MAP kinase inhibitors," *J. Med. Chem.*, vol. 46, no. 22, pp. 4669–4675, 2003.
- [286] J. Dai, B. A. Sullivan, and J. M. G. Higgins, "Regulation of mitotic chromosome cohesion by Haspin and Aurora B," *Dev. Cell*, vol. 11, no. 5, pp. 741–750, 2006.

Anexos

Índice de Tablas

Tabla 1. Inhibidores de CDK8 / CDK19 desarrollados hasta la fecha, los cuales se encuentran en diferentes fases de desarrollo.	44
Tabla 2. Condiciones bioquímicas del ensayo de CDKs.	87
Tabla 3. Condiciones bioquímicas del ensayo de actividad de CDKs.	91
Tabla 4. Relación de inhibidores usados como estándar en los diferentes ensayos bioquímicos . Németh y col.2011. *[255]	95
Tabla 5: Criterios de calidad de un ensayo.	96
Tabla 6. Criterios de solubilidad.....	111
Tabla 7. Concentraciones de sustrato, CYP450 y tampón usados en el ensayo.....	118
Tabla 8. Relación de los inhibidores de referencia usados en el ensayo.....	118
Tabla 9. Parámetros farmacocinéticos.	124
Tabla 10. Condiciones bioquímicas del ensayo.....	131
Tabla 11. Condiciones finales de ensayo.....	136
Tabla 12. Resultados de los escrutinios para la identificación de compuestos activos inhibidores de CDK8.....	139
Tabla 13. Compuestos seleccionados del escrutinio de la librería enfocada del CNIO y basados en ligando (*).141	
Tabla 14. Caracterización de los 29 análogos generados pertenecientes a 12 series químicas diferentes en la primera fase exploratoria.	143
Tabla 15. Caracterización de las series químicas para su priorización.	145
Tabla 16. Inhibición de CDK8 y HASPIN y la relación entre las dos actividades para los análogos con una IC_{50} para CDK8 inferior a 100nM.	152
Tabla 17. Inhibición celular de CDK8 y HASPIN para los análogos con IC_{50} para CDK8 inferior a 10nM.....	153
Tabla 18. Perfil de los compuestos seleccionados tras la fase de HtL.....	159
Tabla 19. Modulación de los biomarcadores de CDK8 y HASPIN para los análogos con IC_{50} para CDK8 inferior a 10nM sintetizados en la fase de LO.....	162
Tabla 20. Perfil de estabilidad microsomal de los inhibidores de CDK8 con mejor ratio de selectividad frente a HASPIN.	163
Tabla 21. Ratios de selectividad para las diferentes CDKs versus CDK8 para los análogos seleccionados según su estabilidad metabólica.....	164
Tabla 22. Propiedades físico químicas, inhibición de citocromos y hERG para los análogos seleccionados para PK.	164
Tabla 23. Perfil bioquímico y celular de los compuestos seleccionados para el estudio cinético.	167
Tabla 24. Valores de K_d y K_i obtenidos en el ensayo con preincubación enzima y inhibidor con lectura continua.	170
Tabla 25. Relación de los valores estimados de las constantes cinéticas. k_{off} , K_{on} y tiempos de residencia determinadas para las moléculas avanzadas y los inhibidores de referencia.....	173
Tabla 26. Caracterización bioquímica y celular de los compuestos más avanzados desarrollados por ETP y los inhibidores de referencia.....	178
Tabla 27. Relación del factor de selectividad respecto a la IC_{50} de CDK8 de las diferentes isoformas de CDKs para las moléculas avanzadas y los inhibidores de referencia.	179

Índice de Figuras

Figura 1. Características distintivas de las células tumorales.....	9
Figura 2. Cifras estimadas (en miles) de la incidencia y mortalidad del cáncer en países desarrollados y menos desarrollados y por sexo.....	10
Figura 3. Terapias dirigidas frente a dianas moleculares específicas implicadas en las diferentes capacidades desarrolladas en la progresión del cáncer. Hanahan y col. 2000 [2]	11
Figura.4. Polifarmacología.....	13
Figura 5. Representación de las diferentes dianas terapéuticas de proteínas quinasas en las diferentes patologías en las que están implicadas. Ferguson y col. 2018 [26]	15
Figura 6. Inhibidores de quinasas aprobados por la FDA en los últimos 30 años. En negro inhibidores para una diana, en rojo inhibidores multidiana. Figura adaptada de Roskoski y col. 2016 [35].....	16
Figura 7. Componentes de la maquinaria de transcripción alterados en cáncer. Bradner y col. 2017 [37]	17
Figura 8. Representación de los diferentes componentes del módulo quinasa dentro del Complejo mediador. Strich y col. 2014 [56].....	20
Figura 9. Vías de señalización en las que CDK8 es un efector modulando los niveles de expresión génica dependiendo del contexto.....	21
Figura 10. Papel de la inhibición de CDK8 mejorando el tratamiento del cáncer al aumentar la actividad de células NK mediadoras en procesos de respuesta inmune. Topham y col. 2009 [74].....	24
Figura 11. Esquema de la organización del módulo quinasa del complejo mediador.	25
Figura 12. Tumores en los que se han detectado alteraciones en los diferentes componentes del dominio quinasa del complejo Mediador.....	27
Figura 13. Estructura general de una proteína quinasa unida a una molécula de ATP.....	33
Figura 14. Alineamiento de las secuencias de CDKs y árbol filogenético.....	35
Figura 15. Estructura cristalográfica de CDK8 / CICLINA C. Schneider y col. 2011 [115]	36
Figura 16. Representación del tipo de inhibidores según su modo de unión.....	37
Figura 17. Diferentes vías que regulan la actividad de HASPIN y la fosforilación de H3-Thr3, en diferentes momentos del ciclo celular. Zhou y col. 2014 [156]	48
Figura 18. Representación esquemática del ciclo de retroalimentación positiva HASPIN-AURORA B en el reclutamiento de CPC al centrómero. Feizbakhsh y col. 2017 [166]	49
Figura 19. Estructura de HASPIN.	54
Figura 20. Cronograma del desarrollo de un nuevo fármaco hasta su aprobación por la FDA. Figura adaptada del artículo divulgativo The Biopharmaceutical Research and Development Process	60
Figura 21. El proceso de Descubrimiento y desarrollo de fármacos: desde el gen hasta el fármaco.	61
Figura 22. Estrategias metodológicas para la identificación de compuestos activos. Bleicher y col. 2003 [204].	63
Figura 23. La regla del 5 de Lipinski.	64
Figura 24. Metodología de trabajo para el desarrollo y validación de un ensayo bioquímico para la fase de cribado o HTS.	65
Figura 25. Propiedades ADME-T.	68
Figura 26. Fases del metabolismo de fármacos (Biotransformación). Rougée, L. R A y col.2014 [220]	71
Figura 27. Esquema de los aspectos cinéticos de las interacciones fármaco-diana.	76
Figura 28. Nuevo modelo en la priorización de compuestos avanzados.	77
Figura 29. Ocupación de la diana dependiendo del tiempo.....	80
Figura 30: Tecnología FRET.....	85
Figura 31. Fundamento general del ensayo “LanthaScreen Eu Binding Assay”. Imagen obtenida de Invitrogen/ThermoFisher Scientific.	86
Figura 32. Diseño experimental de los diferentes ensayos realizados con la tecnología de LantaScreen Eu binding assay.....	88
Figura 33. Esquema general del ensayo LanthaScreen Eu Kinase Assay. Imagen obtenida de Invitrogen/ThermoFisher Scientific.	89

Figura 34. Principio y diseño experimental del ensayo de ADP-GLO™. Imagen obtenida de Promega Corporation.	92
Figura 35. Configuración del formato de placa de ensayo de 384 pocillos. A) Para ensayos de punto simple. B) Para ensayos de DR.	95
Figura 36. Representación de la función matemática utilizada para determinar la IC ₅₀ .	98
Figura 37. Representación de la función para determinar la K _d del trazador.	99
Figura 38. Representación de la función que describe la disociación del inhibidor (desplazamiento por el trazador) en función del tiempo.	100
Figura 39. Modelo de interacción RL.	101
Figura 40. Diseño del formato de placa para ensayos reporteros de actividad β -CATENINA.	105
Figura 41. Diseño del formato de placa para ensayos de viabilidad celular.	108
Figura 42. Distribución de las poblaciones celulares en las fases del ciclo.	109
Figura 43. Fundamento del ensayo de permeabilidad PAMPA. Imagen obtenida de BD corporation.	112
Figura 44. Diseño de la placa para el ensayo de estabilidad microsomal en microsomas humanos, de ratón y de rata.	116
Figura 45. Fundamento del ensayo hERG.	120
Figura 46. Formato placa del ensayo hERG.	121
Figura 47. Establecimiento de las condiciones óptimas de la concentración de enzima y tiempo del ensayo.	127
Figura 48. Determinación de la K _d del trazador 236 y ensayo de unión en función del tiempo a diferentes concentraciones de trazador.	129
Figura 49. Titulación del anticuerpo Eu-Anti-His.	131
Figura 50. Parámetros estadísticos que determinan la calidad y robustez del ensayo.	133
Figura 51. Resultados obtenidos relativos a los controles de calidad en la puesta a punto del ensayo.	134
Figura 52. Miniaturización del ensayo, estabilidad de la enzima y tolerancia al DMSO.	136
Figura 53. Curvas de dosis respuesta de los inhibidores de referencia usados en la validación del ensayo. Comparativa de las IC ₅₀ obtenidas con las descritas en la literatura. *	137
Figura 54. Representación de los resultados del cribado.	140
Figura 55: Caracterización de los compuestos de la serie 5. A) Farmacóforo de la serie 5. B) Curvas de dosis-respuesta de los tres compuestos iniciales. C) Perfil AMDE-T.	146
Figura 56. Mapa de interacciones. "Tree-spot™" del ET-749 a 1 μ M.	147
Figura 57. Inhibición de un panel de CDKs del ETP-749.	148
Figura 58. Caracterización ADME-T del ETP-749.	149
Figura 59. Histograma que compara el porcentaje de análogos sintetizados en la fase de HtL y su inhibición frente a CDK8 y HASPIN.	151
Figura 60. Caracterización de la inhibición de CDKs para los análogos con IC ₅₀ para CDK8 inferior a 10nM.	154
Figura 61. Compuestos seleccionados para ADME-T, solubilidad y PAMPA.	156
Figura 62. Perfilado ADME-T de análogos sintetizados en la fase de HtL.	157
Figura 63. Niveles de compuesto en sangre tras administración vía oral a 10mg/kg en ratones Balbc de los compuestos líder de la fase de HtL y parámetros farmacocinéticos.	160
Figura 64. Análogos sintetizados en la fase de LO.	161
Figura 65. Niveles de compuesto en sangre tras la administración oral a 10mg/kg en ratones Balbc de los compuestos líder de la fase de LO y comparativa con el mejor compuesto obtenido en la fase de HtL.	165
Figura 66. Compuestos seleccionados para la caracterización cinética de unión.	166
A) Estructura del farmacóforo del compuesto ETP-749, del que derivan los 4 análogos estudiados y tabla con las sustituciones de cada compuesto. B) Estructura de los compuestos de referencia CCT251545 y Senexina B [124].	166
Figura 67-. Curvas dosis-respuesta a 20 y 60 minutos de incubación.	169
Figura 68. Representación de las curvas de desplazamiento del complejo enzima-inhibidor.	172
Figura 69. Relaciones entre los parámetros cinéticos k _{off} , k _{on} y K _d .	174
Figura 70. Evolución temporal de la IC ₅₀ desde 10 hasta 300 minutos.	176
Figura 71. Cromatogramas del análisis cualitativo por LC-MS/MS realizado con los inhibidores ETP-193 y ETP-289 con tratamiento láser a tiempo 0, 2 y 5 horas.	177
Figura 72. Efecto antiproliferativo en 4 líneas celulares tras 72h de tratamiento.	180

Figura 73. Perfil de ciclo celular después del tratamiento de 24 horas en la línea MOLM13 con los inhibidores ETP-827, ETP-193, ETP-518 y los inhibidores de referencia CCT251545 y Senexina B.	181
Figura 74. Similitudes entre CDK8 y CDK19.....	186
Figura 75. Flujo de trabajo en las fases de HtL y LO para el desarrollo de inhibidores de CDK8.	187
Figura 76. Estructura del co-cristal del ETP-827 con CDK8 / CycC.	190
Figura 77. Dominio quinasa de CDK8 y HASPIN residuos más relevantes.	200
Figura 78. Interacción del ETP-827 con CDK8 y HASPIN obtenida mediante cristalografía.....	201

Tablas suplementarias:

Tabla suplementaria 1

Compuesto	Estructura (sustitución)	CDK8 IC ₅₀ (M)	HASPIN IC ₅₀ (M)	Compuesto	Estructura (sustitución)	CDK8 IC ₅₀ (M)	HASPIN IC ₅₀ (M)
ETP-342	R1	4,61E-07	6,83E-06	ETP-988	R7	9,79E-07	2,35E-06
ETP-341	R2	5,59E-07	2,92E-07	ETP-986	R7	1,49E-06	1,02E-06
ETP-175	R3	2,10E-09	3,18E-08	ETP-984	R7	1,87E-06	1,84E-05
ETP-450	R3	2,06E-07	2,33E-06	ETP-985	R7	2,41E-06	1,78E-06
ETP-927	R4	4,06E-10	2,75E-08	ETP-989	R7	3,52E-06	1,73E-06
ETP-062	R4	6,34E-09	2,22E-07	ETP-916	R7	5,28E-06	7,55E-06
ETP-064	R4	4,46E-09	4,06E-07	ETP-359	R2+R7	6,29E-06	1,65E-06
ETP-926	R4	4,50E-09	8,48E-08	ETP-765	R3+R5	5,55E-08	1,70E-06
ETP-410	R4	1,09E-08	1,51E-07	ETP-176	R3+R7	1,33E-08	1,51E-07
ETP-936	R4	1,11E-08	2,47E-07	ETP-018	R4+R5	1,91E-10	2,62E-08
ETP-889	R4	3,11E-08	5,29E-08	ETP-048	R4+R5	4,66E-10	2,76E-08
ETP-449	R4	5,47E-08	2,06E-07	ETP-154	R4+R5	2,62E-10	8,51E-09
ETP-830	R4	1,33E-07	4,66E-07	ETP-191	R4+R5	3,14E-10	1,70E-08
ETP-803	R4	1,97E-07	1,53E-07	ETP-192	R4+R5	3,83E-09	1,38E-07
ETP-065	R4	2,81E-07	5,76E-06	ETP-193	R4+R5	2,09E-09	1,07E-08
ETP-826	R4	3,61E-07	5,70E-06	ETP-178	R4+R5	1,11E-09	3,86E-08
ETP-914	R4	4,12E-07	5,71E-08	ETP-178	R4+R7	2,39E-08	5,99E-07
ETP-829	R4	3,51E-07	6,02E-08	ETP-408	R4+R7	1,53E-06	5,96E-06
ETP-831	R4	5,28E-07	4,70E-07	ETP-169	R4+R7	6,79E-06	2,00E-06
ETP-473	R4	6,43E-06	4,28E-06	ETP-174	R4+R7	1,21E-07	5,26E-06
ETP-827	R5	4,97E-10	2,06E-08	ETP-182	R4+R7	8,61E-06	1,29E-05
ETP-846	R5	5,15E-10	2,18E-08	ETP-409	R4+R7	6,52E-07	2,95E-06
ETP-002	R5	1,98E-09	8,74E-08	ETP-055	R5+R6	3,23E-09	3,54E-07
ETP-832	R5	7,75E-09	2,05E-07	ETP-070	R5+R6	1,39E-07	1,12E-06
ETP-887	R5	2,16E-08	3,10E-07	ETP-088	R5+R6	2,08E-08	2,46E-07
ETP-892	R5	2,81E-06	5,21E-06	ETP-177	R5+R7	1,00E-05	2,04E-05
ETP-229	R5	3,18E-06	2,23E-05	ETP-230	R5+R7	5,94E-06	4,90E-05
ETP-890	R5	4,50E-06	6,12E-05	ETP-231	R5+R7	1,00E-05	4,99E-05
ETP-893	R5	1,00E-05	6,34E-05	ETP-828	R5+R7	3,12E-07	6,73E-06
ETP-003	R6	9,02E-09	2,66E-08	ETP-891	R5+R7	2,83E-06	7,86E-05
ETP-448	R6	1,23E-08	9,06E-08	ETP-983	R5+R7	6,11E-08	6,48E-07
ETP-430	R6	2,62E-08	2,35E-07	ETP-147	R5+R7	9,18E-07	2,14E-07
ETP-921	R6	2,62E-08	1,46E-07	ETP-894	R5+R7	1,30E-06	1,86E-06
ETP-414	R6	2,97E-08	7,32E-08	ETP-917	R6+R7	1,60E-07	1,04E-07
ETP-886	R6	3,19E-08	3,21E-07	ETP-429	R6+R7	4,18E-07	6,10E-07
ETP-009	R6	5,49E-08	3,96E-06	ETP-727	R6+R7	4,84E-07	6,82E-08
ETP-042	R6	1,12E-07	6,56E-07	ETP-232	R6+R7	1,97E-06	6,96E-07
ETP-075	R6	2,11E-07	7,43E-07	ETP-262	R6+R7	3,47E-07	3,75E-08
ETP-431	R6	2,69E-07	2,54E-07	ETP-263	R6+R7	5,25E-08	8,93E-08
ETP-872	R6	5,81E-07	7,82E-07	ETP-264	R6+R7	2,00E-06	1,82E-06
ETP-017	R6	1,00E-05	9,33E-07	ETP-265	R6+R7	2,85E-06	3,69E-06
ETP-906	R7	9,22E-08	1,80E-07	ETP-922	R6+R7	7,85E-08	6,83E-07
ETP-750	R7	1,46E-07	3,06E-07	ETP-266	R6+R7	7,69E-09	2,74E-06
ETP-004	R7	1,62E-07	4,18E-07	ETP-180	R4+R5+R7	2,42E-06	8,24E-08
ETP-726	R7	1,75E-07	8,72E-08	ETP-847	R4+R6+R7	8,26E-07	2,93E-06
ETP-987	R7	3,40E-07	3,05E-07	ETP-177	R5+R6+R7	4,84E-07	3,33E-05
ETP-578	R7	3,64E-07	1,27E-06	ETP-181	R5+R6+R7	1,62E-07	1,90E-07
ETP-482	R7	6,71E-07	8,68E-07	ETP-095	R1+R2+R4+R5	1,00E-05	2,36E-05
ETP-218	R7	7,03E-07	3,10E-06				

Tabla suplementaria 2

Compuesto	Estructura (sustitución)	CDK8 IC ₅₀ (M)	CDK19 IC ₅₀ (M)	CDK1 IC ₅₀ (M)	CDK2 IC ₅₀ (M)	CDK4 IC ₅₀ (M)	CDK5 IC ₅₀ (M)	CDK6 IC ₅₀ (M)	CDK7 IC ₅₀ (M)	CDK9 IC ₅₀ (M)
ETP-154	R4	2,62E-10	8,27E-10	5,58E-07	3,73E-06	1,00E-05	3,16E-07	1,00E-05	4,48E-06	1,44E-07
ETP-191	R4+R5	3,14E-10	7,70E-10	4,11E-07	7,04E-07	3,20E-06	9,74E-08	2,67E-06	1,40E-06	5,03E-08
ETP-927	R4	4,06E-10	4,14E-10	1,35E-06	1,95E-06	1,00E-05	1,02E-06	4,99E-06	1,00E-05	6,71E-07
ETP-827	R5	4,97E-10	7,43E-10	6,84E-07	8,95E-07	1,00E-05	3,95E-07	3,69E-06	3,28E-06	3,58E-08
ETP-846	R5	5,15E-10	6,72E-10	1,07E-06	7,05E-07	1,00E-05	3,01E-07	2,77E-06	1,04E-06	4,35E-08
ETP-178	R4+R5	1,11E-09	2,46E-09	3,59E-07	4,63E-07	1,00E-05	3,05E-07	1,00E-05	2,82E-06	8,13E-08
ETP-002	R5	1,98E-09	1,41E-09	2,20E-06	1,72E-06	7,81E-06	3,57E-07	6,39E-06	1,00E-05	2,90E-07
ETP-193	R4+R5	2,09E-09	2,88E-09	5,67E-07	1,50E-06	1,00E-05	2,24E-07	1,00E-05	4,02E-06	1,28E-07
ETP-175	R3	2,10E-09	1,41E-09	8,46E-06	1,00E-05	1,00E-05	1,23E-06	4,56E-06	3,78E-06	3,00E-08
ETP-055	R5+R6	3,23E-09	1,64E-08	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	8,05E-06	1,00E-05	4,91E-07	1,41E-06
ETP-192	R4+R5	3,83E-09	6,10E-09	5,03E-06	1,79E-06	1,00E-05	3,45E-07	3,56E-06	1,00E-05	4,41E-07
ETP-064	R4	4,46E-09	1,42E-08	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	8,98E-06
ETP-062	R4	6,34E-09	7,14E-09	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	3,10E-06
ETP-266	R6+R7	7,69E-09	2,07E-08	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	1,82E-06
ETP-832	R5	7,75E-09	1,15E-08	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	8,33E-06

Tabla suplementaria 3

Compuestos	Estructura (sustitución)	CDK8 IC ₅₀ (M)	Solubilidad en PBS [μ M]	PAMPA (10 ⁻⁶ cm/s)	MS humanos (% Compuesto remanente)	MS ratón (% Compuesto remanente)	MS rata (% Compuesto remanente)
ETP-175	R3	2,10E-09	100	3,70	64,95	6,15	42,65
ETP-926	R4	4,50E-09	100	3,13	70,30	45,75	75,45
ETP-927	R4	4,06E-10	100	2,45	87,70	12,55	69,15
ETP-062	R4	6,34E-09	100	3,15	72,85	25,65	4,20
ETP-064	R4	4,46E-09	100	0,99	94,77	65,75	30,97
ETP-002	R5	1,98E-09	100	11,91	104,35	16,25	72,65
ETP-827	R5	4,97E-10	100	13,26	95,55	39,90	83,46
ETP-832	R5	7,75E-09	5	9,09	85,85	41,65	63,50
ETP-846	R5	5,15E-10	100	10,28	76,00	53,00	79,90
ETP-003	R6	9,02E-09	100	8,65	113,2	7,85	36,55
ETP-018	R4+R5	1,91E-10	100	10,16	96,45	23,50	38,50
ETP-048	R4+R5	4,66E-10	100	8,06	88,45	7,85	60,05
ETP-154	R4+R5	2,62E-10	100	16,12	96,85	21,30	38,80
ETP-178	R4+R5	1,11E-09	100	12,59	33,56	73,46	0,41
ETP-191	R4+R5	3,14E-10	50	14,38	45,38	60,98	27,16
ETP-192	R4+R5	3,83E-09	50	5,01	116,10	80,8	93,20
ETP-193	R4+R5	2,09E-09	100	9,80	104,92	85,47	87,77
ETP-055	R5+R6	3,23E-09	100	10,84	65,72	39,20	43,30
ETP-266	R6+R7	7,69E-09	100	0,00	82,70	81,35	88,95

Tabla suplementaria 4

Compuesto	Estructura (sustitución)	CDK8 IC ₅₀ (M)	P450_1A2 (Inh %)	P450_2C19 (Inh %)	P450_2C9 (Inh %)	P450_2D6 (Inh %)	P450_3A4 (Inh %)	hERG IC ₅₀ (μ M)
ETP-175	R3	2,10E-09	>30	>30	>30	>30	33,0	>30
ETP-926	R4	4,50E-09	>30	>30	>30	>30	>30	18,2
ETP-927	R4	4,06E-10	>30	>30	>30	37,7	>30	>30
ETP-062	R4	6,34E-09	66,9	>30	58,5	>30	>30	14,77
ETP-064	R4	4,46E-09	>30	>30	>30	>30	>30	>30
ETP-002	R5	1,98E-09	>30	>30	>30	>30	>30	>30
ETP-827	R5	4,97E-10	>30	>30	>30	>30	48,5	>30
ETP-832	R5	7,75E-09	>30	>30	>30	>30	>30	N/A
ETP-846	R5	5,15E-10	>30	>30	>30	>30	59,2	>30
ETP-003	R6	9,02E-09	32,1	31,3	>30	>30	37,6	13,9
ETP-018	R4+R5	1,91E-10	77,8	>30	73,9	>30	>30	N/A
ETP-048	R4+R5	4,66E-10	55,6	>30	>30	>30	>30	N/A
ETP-154	R4+R5	2,62E-10	69,4	>30	66,8	>30	55,7	>30
ETP-178	R4+R5	1,11E-09	>30	>30	>30	>30	>30	>30
ETP-191	R4+R5	3,14E-10	>30	>30	>30	>30	>30	>30
ETP-192	R4+R5	3,83E-09	>30	>30	>30	>30	>30	>30
ETP-193	R4+R5	2,09E-09	>30	50,8	54,2	>30	67,0	>30
ETP-055	R5+R6	3,23E-09	>30	66,8	33,6	52,5	73,1	>30
ETP-266	R6+R7	7,69E-09	>30	>30	>30	>30	>30	>30

Tabla suplementaria 5

Compuesto	Estructura (sustitución)	CDK8 IC ₅₀ (M)	HASPIN IC ₅₀ (M)
ETP-234	R2	3,93E-06	1,14E-06
ETP-386	R4	8,54E-08	3,43E-06
ETP-380	R4	1,40E-06	1,00E-05
ETP-229	R6	1,27E-07	2,60E-07
ETP-230	R6	4,33E-09	3,45E-08
ETP-280	R1+R5	5,65E-08	9,84E-07
ETP-518	R2+R5	6,02E-09	4,76E-07
ETP-222	R4+R5	2,78E-10	1,25E-08
ETP-450	R4+R5	2,80E-10	1,79E-08
ETP-241	R4+R5	4,07E-10	9,52E-08
ETP-523	R4+R5	5,27E-10	4,01E-08
ETP-324	R4+R5	5,70E-10	2,90E-07
ETP-514	R4+R5	5,72E-10	1,24E-07
ETP-357	R4+R5	8,96E-10	2,57E-08
ETP-242	R4+R5	1,15E-09	5,22E-07
ETP-487	R4+R5	1,19E-09	7,15E-07
ETP-358	R4+R5	1,36E-09	7,49E-08
ETP-223	R4+R5	1,41E-09	4,21E-08
ETP516	R4+R5	2,33E-09	5,78E-08
ETP-432	R4+R5	2,37E-09	1,56E-06
ETP-326	R4+R5	2,41E-09	2,34E-08
ETP-515	R4+R5	2,49E-09	7,14E-07
ETP-524	R4+R5	2,58E-09	1,84E-07
ETP-325	R4+R5	3,33E-09	2,09E-06
ETP-449	R4+R5	3,41E-09	2,46E-07
ETP-517	R4+R5	4,46E-09	1,39E-06
ETP-430	R4+R5	4,50E-09	7,23E-07
ETP-474	R4+R5	5,18E-09	7,59E-08
ETP-231	R4+R5	1,42E-08	1,36E-07
ETP-433	R4+R5	3,05E-08	1,64E-06
ETP-431	R4+R5	6,04E-08	2,81E-06
ETP-246	R4+R5	2,96E-07	6,24E-09
ETP-247	R4+R5	1,70E-06	8,31E-08
ETP-289	R5+R6	2,02E-09	1,75E-08
ETP-232	R5+R6	1,39E-08	1,06E-07
ETP-480	R6+R7	1,18E-09	1,01E-08
ETP-496	R6+R7	1,90E-09	5,09E-09
ETP-281	R1+R4+R5	1,00E-05	6,32E-07
ETP-279	R1+R5+R7	3,25E-06	4,84E-07
ETP-327	R4+R5+R6	1,82E-08	8,36E-09
ETP-328	R4+R5+R6	9,35E-09	7,35E-09
ETP-492	R4+R5+R6	1,41E-09	1,64E-08
ETP-215	R4+R5+R7	1,63E-06	7,84E-06
ETP-217	R4+R5+R7	4,87E-08	1,23E-06
ETP-282	R1+R4+R5+R7	1,00E-05	2,43E-05
ETP-277	R1+R4+R5+R7	1,00E-05	2,06E-05

Tabla suplementaria 6

Compuesto6	Estructura (sustitución)	CDK8 IC ₅₀ (M)	Solubilidad en PBS [μM]	PAMPA (10-06 cm/s)	MS humanos (% Compuesto remanente)	MS ratón (% Compuesto remanente)	MS rata (% Compuesto remanente)
ETP-222	R4+R5	2,78E-10	100	15,08	59,10	60,65	34,90
ETP-230	R6	4,33E-09	100	10,55	88,40	60,15	61,87
ETP-242	R4+R5	1,15E-09	10	5,79	4,00	27,05	10,85
ETP-289	R5+R6	2,02E-09	100	17,03	74,55	66,50	53,05
ETP-326	R4+R5	2,41E-09	100	4,33	88,70	92,85	99,35
ETP-328	R4+R5+R6	9,35E-09	100	6,30	30,85	39,10	12,25
ETP-357	R4+R5	8,96E-10	10	13,96	129,85	68,85	89,50
ETP-358	R4+R5	1,36E-09	50	5,21	97,45	86,15	93,80
ETP-430	R4+R5	4,50E-09	100	5,85	44,45	21,75	0,00
ETP-432	R4+R5	2,37E-09	100	4,34	28,60	3,20	2,50
ETP-474	R4+R5	5,18E-09	100	14,98	5,90	0,30	0,00
ETP-480	R6+R7	1,18E-09	50	5,80	103,00	0,00	37,00
ETP-492	R4+R5+R6	1,41E-09	10	13,99	15,10	20,1	11,75
ETP-496	R6+R7	1,90E-09	100	9,41	50,00	2,00	37,00
ETP-516	R4+R5	3,56E-09	100	11,90	65,80	4,05	0,65

Tabla suplementaria 7

Compuesto	Estructura (sustitución)	CDK8 IC ₅₀ (M)	CDK19 IC ₅₀ (M)	HASPIN IC ₅₀ (M)	CDK1 IC ₅₀ (M)	CDK2 IC ₅₀ (M)	CDK4 IC ₅₀ (M)	CDK5 IC ₅₀ (M)	CDK6 IC ₅₀ (M)	CDK7 IC ₅₀ (M)	CDK9 IC ₅₀ (M)
ETP-324	R4+R5	5,70E-10	1,10E-09	2,90E-07	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	5,69E-06	1,00E-05	1,00E-05	5,70E-06
ETP-514	R4+R5	5,72E-10	2,32E-10	1,03E-07	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	4,84E-06
ETP-515	R4+R5	2,49E-09	4,54E-10	7,14E-07	7,99E-06	4,33E-06	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	6,69E-07	1,23E-06
ETP-518	R2+R5	9,45E-09	9,58E-09	4,76E-07	5,02E-06	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	3,71E-06
ETP-325	R4+R5	3,33E-09	8,35E-09	2,09E-06	1,00E-05	1,00E-05	1,00E-05	5,15E-06	1,00E-05	3,68E-06	3,54E-06
ETP-326	R4+R5	2,41E-09	4,05E-09	2,34E-08	1,05E-06	5,11E-07	1,90E-06	1,69E-07	3,29E-06	3,63E-06	8,97E-08
ETP-357	R4+R5	8,96E-10	1,10E-09	2,57E-08	6,82E-07	3,66E-07	1,00E-05	8,01E-08	1,00E-05	3,64E-06	2,32E-07
ETP-358	R4+R5	1,36E-09	1,81E-09	7,49E-08	5,63E-07	6,30E-07	2,58E-06	1,66E-07	1,00E-05	1,00E-05	2,43E-07